

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



COMPARACIÓN DE LAS CORRIENTES IÓNICAS IMPLICADAS EN LA  
REPOLARIZACIÓN DE LAS AURÍCULAS DERECHA E IZQUIERDA  
HUMANAS EN PACIENTES CON RITMO SINUSUAL Y CON  
FIBRILACIÓN AURICULAR

TESIS DOCTORAL DE:

**MARTA GONZÁLEZ DE LA FUENTE**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**JUAN TAMARGO MENÉNDEZ  
EVA DELPÓN MOSQUERA  
RICARDO CABALLERO COLLADO**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**COMPARACIÓN DE LAS CORRIENTES IÓNICAS  
IMPLICADAS EN LA REPOLARIZACIÓN DE LAS  
AURÍCULAS DERECHA E IZQUIERDA HUMANAS  
EN PACIENTES EN RITMO SINUSAL Y CON  
FIBRILACIÓN AURICULAR**

**TESIS DOCTORAL**

**Marta González de la Fuente**

**DIRECTORES**

**Prof. Juan Tamargo Menéndez**

**Prof. Eva Delpón Mosquera**

**Prof. Ricardo Caballero Collado**

**Madrid, 2013**



A mis padres.

A Jaime.

A las miocitas.

Esta Tesis es vuestra también.





## **AGRADECIMIENTOS**



*“Descifrar lo que está delante de nuestros ojos requiere una lucha constante”.*

*Orwell*

Son muchas las personas a las que tengo que agradecer haber llegado hasta aquí.

En primer lugar, a mis directores de Tesis, los profesores Juan Tamargo Menéndez, Eva Delpón Mosquera y Ricardo Caballero Collado.

Al Profesor Juan Tamargo Menéndez, por acogerme en su grupo de investigación y por depositar su confianza en mí. Ha sido un honor poder trabajar en un equipo como éste. Y ha sido muy divertido compartir charlas y pitis contigo. Eres un gran maestro y una gran persona, Juan, muchas gracias por todo.

A la Profesora Eva Delpón Mosquera, por enseñarme que el esfuerzo al final tiene su recompensa, por ser un ejemplo de constancia y dedicación al trabajo. Te deseo todo lo mejor, jefa. Gracias por confiar en mí durante estos tres años.

Al Profesor Ricardo Caballero Collado, por todo lo que me ha enseñado. Aunque las “nuevas generaciones” no sepamos “compensar” y a veces “no echemos la fleca” cuando deberíamos, creo que has sido un estupendo maestro. Gracias.

Sin duda, si a alguien debo estar agradecida es a mis compañeros de laboratorio.

En primer lugar a mis miocitas, la Doctora Irene Amorós García y la casi-casi Doctora Adriana Barana Muñoz. Porque sin vuestro trabajo esto habría sido imposible, esta Tesis también es vuestra. Debería incluir un apartado en “Material y métodos” con las risas, las lágrimas, los pitis al sol, las cañas en el Hoces y las copas en el gallego, han sido totalmente necesarios. Porque he aprendido casi todo de vosotras, porque aunque a veces fuera un poco pesadita con mis preguntas, siempre habéis estado ahí para enseñar y ayudar a la becaria cigoto. Porque no sólo sois mis compañeras, también mis amigas. GRACIAS.

Al Licenciado Pablo Dolz Gaitón, por todos los momentos compartidos. Porque entrar a la vez une, por haber sido mi hermano en esto, por los buenos momentos que hemos pasado dentro y fuera del labo, por tu comprensión. Gracias.

A los dos, Adri y Pablo, muchísimo ánimo con vuestras tesis, ¡ya no os queda nada! Y a ti Ire, ahora que ya eres Doctora... ¡sólo me queda decirte que estoy segura de que vas a ser una mamá estupenda!

A Sandra Sacristán García, pequeña crack de la disociación de miocitos. Por los buenos ratos juntas, porque siempre llenas de alegría el laboratorio. Por tu constancia y dedicación al trabajo. Ha sido un placer enseñarte lo poco que sé... Gracias a ti también.

Al Doctor Ricardo Gómez García, porque siempre estaba ahí para arreglarme los desastres en mi equipo, porque durante el tiempo en el que hemos coincidido en el labo he aprendido muchísimo de él. Espero que todo vaya genial en tu nuevo grupo de investigación.

A Paloma Vaquero, por tu ayuda con todos los papeleos y tus enseñanzas informáticas. Nunca dejas de sorprenderme. Por los buenos ratos que pasamos contigo y tus historias (la hora del café no es lo mismo cuando no estás tú), por preocuparte siempre de si estamos bien, por los guiños de cómplice. Gracias.

A las nuevas incorporaciones del laboratorio, Martita, Marcos y Mercedes. Trabajad duro, seréis unos grandes “pinchauvas”, estoy segura.

A Jaime. Porque sin ti nada de esto tendría sentido. Porque me ayudas tanto, por entenderlo todo, aunque no sepas nada de “pinchar”, de miocitos y de células “pochas”. Por saber tranquilizarme siempre, por tu paciencia, por ponerme los pies en el suelo cuando yo no sé cómo hacerlo, por ponerle siempre el punto positivo a las cosas cuando yo no lo encuentro. Porque tus abrazos me transmiten toda la paz que necesito. Por todo lo que comparto contigo. Por estar siempre cerca, a pesar de estar lejos. GRACIAS. Es tu Tesis también, no habría podido sin ti.

A mi familia. Papá y mamá, gracias por permitirme llegar hasta aquí. Por vuestro apoyo siempre, aunque tenga mucho genio y sea un poquito insoportable a veces. Porque sois un ejemplo de trabajo y de constancia. Porque al final, todo lo que soy, lo he aprendido de vosotros. Por vuestro cariño y ayuda. GRACIAS.

A mis hermanos, a Diego, por ser un ejemplo de superación, por todo el cariño con el que me tratas siempre. Te admiro mucho, hermano mayor. A Fran y a María, gracias por escucharme y comprenderme. No dejéis de aprender nunca. Fran, ánimo con tu Tesis, estoy segura de que aunque el camino sea complicado, tu pasión por la Historia te llevará muy lejos, digan lo que digan. Marieta, mi niña no-tan-pequeña ya, mucha suerte en tu nueva vida en Alemania. Ojalá encuentres tu sitio pronto. Serás una gran trabajadora social, lo sé. Que las circunstancias actuales no te cambien, pequeña. Aguanta fuerte.

A mis amigos... A los de siempre, Pollo, Tita, Emma, Isa, Tou, Pili... Por mucho que pasen los años, siempre estáis ahí.

A las niñas de la uni, Cris, Isa, Lau y Evo. Por los tiempos que pasamos, por ser el principio de todo esto. Porque la botica une, y a pesar de nuestras ocupadísimas vidas siempre hay un huequito para vosotras. Gracias por confiar siempre en mí. No sabéis todo lo que valoro un “yo sé que tú puedes” viniendo de vosotras.

A los nuevos amigos, escuercitos y bolardetes... Todo es más fácil cuando se está rodeada de gente como vosotros. ¡Habéis sido tan importantes para mí en estos últimos tiempos! Gracias.

A mi “familia madrileña”, cada vez más desperdigada, a la pequeña Carol, a Tichu, a Rous, a Lau, a Tere, a los niños. Estos 10 años en Madrid han sido increíbles. A mi compi estos últimos meses... Señor, las penas son menos penas con una botella de Apocalipsis y el cariño de una burgalesa con un extraño acento canario.

A los Dres. Almendral, Atienza, Fernández-Avilés, Pinto y demás equipo de los servicios de Cardiología y de Cirugía Cardiovascular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por proporcionarnos las muestras auriculares humanas utilizadas en esta Tesis Doctoral.

A María Isabel Colado Megía y a Ignacio Lizasoain Hernández, actual y antiguo director del Departamento, y, en general, a todo el Departamento de Farmacología de la Facultad de medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por acogerme estos tres años.

Al Instituto de Salud Carlos III y a Astra-Zeneca por financiar mi estancia durante este periodo pre-doctoral.



## **ABSTRACT**





## INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Atrial fibrillation (AF) is the most prevalent arrhythmia and the main risk factor associated with cerebrovascular events. Nowadays, pharmacological treatment of AF is clearly suboptimal, mainly due to rapid changes (4 to 6 hours after the onset) in the electrical properties of the atria (electrical remodelling) induced by the arrhythmia itself. This electrical remodelling promotes the maintenance and recurrence of AF, and it is characterized by a marked shortening of the atrial action potential (AP) duration (APD) and refractoriness as a consequence of changes in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  channel density.

At least three different types of right atrial cells have been identified on the basis of their outward  $\text{K}^{+}$  repolarizing currents, and, consequently, on the morphology of their AP. This fact shows the existence of intra-atrial heterogeneities in the repolarizing currents in physiological conditions. However, up to date, all studies regarding electrical remodelling produced by AF, considered the myocytes of the right atrium (RA) electrically identical, and no data were provided on whether AF-induced electrical remodelling differentially affected diverse atrial cell types.

Besides the intra-atrial differences, in humans, as in other species, several data point towards the existence of interatrial dissimilarities in the repolarizing currents. Refractory period is shorter in the left atrium (LA) than in the RA, and inward rectifier  $\text{K}^{+}$  currents are greater in the left than in the right atrial cells. Therefore, it could be possible that chronic AF-induced electrical remodelling could differentially affect voltage-dependent  $\text{K}^{+}$  currents in each atrium. However, studies comparing the voltage-dependent repolarizing currents in the human RA and LA, as well as data regarding how AF-induced electrical remodelling affects each atrium, are scarce or absent.

It has been proposed that  $\beta$ -adrenergic stimulation has profound influence in the genesis and maintenance of AF. Moreover, previous data suggest that chronic AF is associated with an enhancement of  $\beta$ -adrenoceptor effects on the depolarizing  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{CaL}}$ ). However, up to date, the effects of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation on atrial repolarizing currents, as well as the effects produced by  $\beta$ -adrenoceptor stimulation on the characteristics of the AP have not been compared yet in myocytes from the RA and LA obtained from patients in sinus rhythm (SR) and with chronic AF.

Therefore, the objectives of the present Doctoral Thesis were:

1. To compare voltage-dependent  $K^+$  currents in enzymatically dissociated myocytes obtained from the right (RAA) and the left (LAA) atrial appendages of patients in SR.
2. To determine the effects of chronic AF on voltage-dependent  $K^+$  currents in enzymatically dissociated myocytes from the RAA and the LAA obtained from patients with chronic AF and to compare the results with those obtained in myocytes from patients in SR.
3. To determine the effects of  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation on the transient outward ( $I_{to1}$ ), the ultrarapid ( $I_{Kur}$  or  $I_{sus}$ ) and the slow ( $I_{Ks}$ ) components of the delayed rectifier  $K^+$  current, the inward rectifier  $K^+$  current ( $I_{K1}$ ) and on the  $I_{CaL}$  in enzymatically dissociated myocytes from the RAA and the LAA of patients in SR.
4. To determine the effects of  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation on the  $I_{to1}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Ks}$  and  $I_{K1}$  and on the  $I_{CaL}$  in enzymatically dissociated myocytes from the RAA and the LAA of patients with chronic AF and to compare the results with those obtained in myocytes from patients in SR.
5. To compare the effects of  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation on the characteristics of the APs registered in enzymatically dissociated myocytes of patients in SR and with chronic AF.

## **METHODS AND RESULTS**

Currents and APs were recorded using the whole-cell patch clamp configuration in enzymatically dissociated myocytes from the RAA and LAA of patients in SR and with chronic AF undergoing cardiac surgery. Analysis of mRNA expression was performed either by semiquantitative reverse-transcription PCR or by real-time quantitative PCR.

In SR, LAA and RAA myocytes were divided in three types according to the main voltage-dependent repolarizing  $K^+$  current they exhibited at plateau potentials ( $I_{to1}$ -predominant,  $I_{sus}$ -predominant and intermediate). Chronic AF differentially modified the proportion of these three cell types on each atrium. Chronic AF reduced  $I_{to1}$  more markedly in the LAA than in the RAA. Therefore, an atrial right-to-left  $I_{to1}$  gradient was created by chronic

AF. In contrast,  $I_{Kur}$  was more markedly reduced in the RAA than in the LAA, thus abolishing the atrial right-to-left  $I_{Kur}$  gradient observed in SR. Importantly, in both atria, chronic AF markedly increased  $I_{Ks}$ . This increase can critically contribute to the shortening of APD in chronic AF patients.

Stimulation of  $\beta_1$ -adrenoceptors with isoproterenol decreased both  $I_{to1}$  and  $I_{K1}$ . Chronic AF significantly enhanced this inhibition, this effect being more marked in the LA than in the RA. Furthermore,  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation increased both  $I_{CaL}$  and  $I_{Ks}$ . Chronic AF dramatically enhanced  $\beta_1$ -adrenoceptor-mediated increase of  $I_{Ks}$ , and also potentiated  $I_{CaL}$  increase, in both cases, the effect being significantly greater in the LA. Conversely,  $I_{Kur}$  was insensitive to low isoproterenol concentrations.

As a consequence of chronic AF-induced atrial remodelling, stimulation of  $\beta_1$ -adrenoceptor produced different effects on APD in SR and chronic AF myocytes. In SR myocytes, isoproterenol lengthened APD, whereas in chronic AF myocytes it further shortened it. Quantitative PCR revealed that chronic AF up-regulated  $\beta_1$ -adrenoceptor expression, preferentially in the LA.

## CONCLUSIONS

We demonstrate that in SR there is intra-atrial heterogeneity in the repolarizing currents. Chronic AF profoundly, but differentially, affects both atria, which promotes interatrial differences. The results presented in this Doctoral Thesis are, to our knowledge, the first electrophysiological demonstration of chronic AF-induced  $I_{Ks}$  increase, which could be critical in chronic AF-induced shortening of APD and in the promotion of fibrillatory activity, providing a putative new target for the treatment of AF.

We also demonstrate, for the first time, that chronic AF increases the effects of  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation on human repolarizing currents preferentially in the LA. In chronic AF cells, isoproterenol further shortens the  $APD_{90}$  as a consequence of the chronic AF-induced up-regulation of  $\beta_1$ -adrenoceptors and derangements in ion channels. Therefore, it could be hypothesized that sympathetic stimulation further promotes reentry, thus favoring AF maintenance.



## **ABREVIATURAS**



4-AP: 4-Aminopiridina	FV: Fibrilación ventricular
AC: Adenilato ciclasa	$\Delta G$ : Energía de Gibbs
ACC: <i>American College of Cardiology</i>	G: Conductancia
ACh: Acetilcolina	GMPC: Guanosín monofosfato cíclico
AD: Aurícula derecha	GRK: Cinasas de las proteínas G acopladas a receptores
ADP: Adenosín bifosfato	$[H^+]_i$ : Concentración intracelular de protones
AHA: <i>American Heart Association</i>	HCN: Canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos ( <i>Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide-gated channels</i> )
AI: Aurícula izquierda	HEK293: Células embrionarias humanas de riñón ( <i>Human Embryonic Kidney cells</i> )
AKAP: Proteína de anclaje para la PKA	hERG: <i>Human Ether-à-go-go Related Gene</i>
AMPC: Adenosín monofosfato cíclico	HPTX: Toxina heteropoda
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	HTA: Hipertensión arterial
ATP: Adenosín trifosfato	HVA: <i>High-Voltage Activated</i>
AV: Aurículo-ventricular	I: Intensidad de corriente macroscópica
$[Ca^{2+}]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular de $Ca^{2+}$	$I_{Ca}$ : Corriente de entrada de $Ca^{2+}$
CaM: Calmodulina	$I_{Ca,L}/I_{Ca,T}$ : $I_{Ca}$ generada por canales tipo L/tipo T
CaMKII: Proteína cinasa II dependiente de $Ca^{2+}$ /CaM	IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
CE <sub>50</sub> : Concentración que produce la mitad del efecto máximo observado	$I_f$ : Corriente hiperpolarizante marcapasos ( <i>funny current</i> )
C <sub>m</sub> : Capacitancia de la membrana celular	$I_{K1}$ : Corriente de $K^+$ con rectificación interna
C-terminal: Carboxilo-terminal	$I_{K,ACh}$ : Corriente de salida de $K^+$ activada por ACh
Cx: Conexinas	$I_{K,ATP}$ : Corriente de $K^+$ sensible a ATP
D: Dominio	$I_{Kir2}$ : Corriente de $K^+$ generada por canales Kir2
DHP: 1,4-Dihidropiridinas	$I_{Kr}$ : Corriente rectificadora tardía de $K^+$ de activación rápida
DIA: Dominio de interacción $\alpha$ del canal de $Ca^{2+}$	$I_{Ks}$ : Corriente rectificadora tardía de $K^+$ de activación lenta
DIB: Dominio de interacción $\beta$ del canal de $Ca^{2+}$	$I_{Kur}$ : Corriente rectificadora tardía de $K^+$ de activación ultrarrápida
DPA: Duración del potencial de acción	$I_{Na}$ : Corriente de entrada de $Na^+$
DPA <sub>n</sub> : DPA medida al n % de la repolarización	$I_{Na,L}$ : Corriente tardía de entrada de $Na^+$
DPP: Proteínas dipeptidilpeptidasas	IMC: Índice de masa corporal
DTX: Dendrotoxina	INR: tiempo de protrombina según el índice internacional normalizado
E: Potencial transmembrana	
ECG: Electrocardiograma	
$E_K$ : Potencial de Nernst para el $K^+$	
$E_m$ : Potencial de membrana	
$E_{Na}$ : Potencial de Nernst para el $Na^+$	
ESC: <i>European Society of Cardiology</i>	
F: Constante de Faraday ( $9.65 \times 10^4$ C/mol)	
FA: Fibrilación auricular	
FAC: Fibrilación auricular crónica	



[ion] <sub>e/i</sub> : Concentración extra/intracelular del ion	PDE: Fosfodiesterasa
IP <sub>3</sub> : 1,4,5- Inositol trifosfato	PDZ: <i>Post synaptic density, Discs large, and Zonula occludens</i>
ISO: Isoproterenol	PIP <sub>2</sub> : Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
I <sub>TI</sub> : Corriente transitoria de entrada despolarizante	PKA: Proteína cinasa dependiente de AMPc
I <sub>to1</sub> : Corriente transitoria de salida de K <sup>+</sup> cardíaca	PKC: Proteína cinasa C
I <sub>to2</sub> : Corriente transitoria de salida de Cl <sup>-</sup> activada por Ca <sup>2+</sup>	PKG: Proteína cinasa dependiente de GMPc
I-V: Relación intensidad de corriente-voltaje	PKI: Proteína inhibidora de la PKA
k: Valor de la pendiente de la curva	PLC: Fosfolipasa C
[K <sup>+</sup> ] <sub>e/i</sub> : Concentración extra/intracelular de K <sup>+</sup>	PMA: Miristato-acetato de forbol ( <i>Phorbol Myristate Acetate</i> )
K <sub>ACh</sub> : Canales de K <sup>+</sup> activados por ACh	PR: Potencial de reposo
K <sub>Ca</sub> : Canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>2+</sup>	Q: Carga
KChAP: K <sup>+</sup> <i>Channel-Associated Protein</i>	R: Constante universal de los gases (8.31 J/mol·K)
KChIP: <i>Kv Channel Interacting Protein</i>	RS: Ritmo sinusal
Kir: Canales de K <sup>+</sup> rectificadores internos	RyR2: Receptor/canal de rianodina tipo 2
Kv: Canales de K <sup>+</sup> dependientes de voltaje	SA: Senoauricular
LVA: <i>Low-Voltage Activated</i>	SB: Síndrome de Brugada
MAGUK: Guanilato-Cinasa asociada a membrana	SERCA: ATPasa del retículo sarcoplásmico
minK: <i>Minimal K<sup>+</sup> channel subunit</i>	SNAP: (±)-S-Nitroso-N-acetilpenicilamina
MiRP: <i>MinK-Related Peptides</i>	SJLN: Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen
MLC-2: Cinasa de la cadena ligera de miosina	SNC: Sistema nervioso central
[Na <sup>+</sup> ] <sub>e/i</sub> : Concentración extra/intracelular de Na <sup>+</sup>	SNP: Sistema nervioso periférico
NAB: <i>N-terminal A and B box</i> , también dominio T1	SQTC: Síndrome de QT corto
NBD: Dominios de unión de nucleótidos	SQTL: Síndrome de QT largo
NCX: Intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	SRAA: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
n <sub>H</sub> : Coeficiente de Hill	SRT: Síndrome de repolarización temprana
NO: Óxido nítrico	STAT: <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
N-terminal: Amino-terminal	SUR: Receptor de sulfonilureas
NYHA: <i>New York Heart Association</i>	τ: Constante de tiempo
OAD: Orejuela auricular derecha	T: Temperatura absoluta
OAI: Orejuela auricular izquierda	TALK: <i>TWIK-related ALkalosis-activated K<sup>+</sup> channels</i>
P <sub>ion</sub> : Permeabilidad de la membrana a un determinado ion	TASK: <i>TWIK-related Acid-Sensitive K<sup>+</sup> channels</i>
P <sub>o</sub> : Probabilidad de apertura del canal	TEA: Tetraetilamonio
PA: Potencial de acción	TGF-β <sub>1</sub> : Factor de crecimiento tisular β <sub>1</sub>
PaTX: Piroxotoxinas	THIK: <i>Tandem pore domain Halothane Inhibited K<sup>+</sup> channels</i>
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )	TM: Transmembrana (segmento)
PC <sub>R</sub> : Proteína C reactiva	

TRAAK: *TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated*  
*K<sup>+</sup> channels*

TREK: *TWIK-RElated K<sup>+</sup> channels*

TTX: Tetrodotoxina

TWIK: *Tandem of P domains in Weak Inward rectifier*  
*K<sup>+</sup> channels*

V: Voltaje

VI: Ventrículo izquierdo

VP: Venas pulmonares



## **ÍNDICE**



<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. Electrofisiología cardíaca .....	3
1.1. Excitabilidad .....	4
1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular .....	6
1.1.2. El potencial de acción .....	8
1.1.2.a. PA rápidos o dependientes de $\text{Na}^+$ .....	9
1.1.2.b. PA lentos o dependientes de $\text{Ca}^{2+}$ .....	12
1.2. Automatismo .....	13
1.3. Refractoriedad .....	14
1.4. Propagación del impulso cardíaco .....	15
2. Canales iónicos dependientes de voltaje implicados en el potencial de acción cardíaco .....	17
2.1. Canales de $\text{Na}^+$ .....	17
2.1.1. Estructura de los canales de $\text{Na}^+$ .....	18
2.1.2. Características de la $I_{\text{Na}}$ .....	20
2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de $\text{Na}^+$ cardíacos .....	22
2.2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ .....	22
2.2.1. Estructura de los canales de $\text{Ca}^{2+}$ .....	23
2.2.2. Características de la $I_{\text{Ca,L}}$ .....	26
2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{\text{Ca,L}}$ .....	27
2.2.4. Canalopatías asociadas al canal de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L .....	27
2.3. Canales de $\text{K}^+$ .....	28
2.3.1 Canales 2TM/1P .....	30
2.3.1.a La rectificación interna en los canales Kir .....	31
2.3.1.b Estructura de los canales Kir .....	33
2.3.1.c Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales Kir .....	35
I. La $I_{\text{K1}}$ .....	35
I.a. Características de la $I_{\text{K1}}$ .....	35
I.b. Composición de los canales que generan la $I_{\text{K1}}$ .....	37
II. La $I_{\text{K,ATP}}$ .....	38
II.a. Composición de los canales que generan la $I_{\text{K,ATP}}$ .....	38
III. La $I_{\text{K,ACh}}$ .....	39
III.a. Características de la $I_{\text{K,ACh}}$ .....	39
III.b. Composición de los canales que generan la $I_{\text{K,ACh}}$ .....	41
2.3.2. Canales 4TM/2P .....	41

2.3.3. Canales 6TM/1P .....	43
2.3.3.a. Estructura de los canales Kv .....	45
I. La subunidad $\alpha$ .....	47
II. Subunidades auxiliares .....	50
2.3.3.b. La inactivación de los canales Kv .....	53
2.3.3.c. Principales corrientes generadas a través de canales Kv	
que intervienen en el PA cardíaco .....	56
I. La $I_{to}$ .....	56
I.a. Características de la $I_{to1}$ .....	56
I.b. Composición de los canales que generan la $I_{to1}$ .....	58
I.b.1. Composición de la $I_{to1,s}$ .....	58
I.b.2. Composición de la $I_{to1,f}$ .....	59
I.c. Regulación de la $I_{to1}$ .....	62
I.d. Propiedades farmacológicas de la $I_{to1}$ .....	63
I.e. La $I_{to1}$ en diversas patologías .....	64
II. La $I_{Kur}$ .....	65
II.a. Características de la $I_{Kur}$ .....	65
II.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kur}$ .....	66
II.c. Regulación de la $I_{Kur}$ .....	67
II.d. Propiedades farmacológicas de la $I_{Kur}$ .....	67
II.e. La $I_{Kur}$ en diversas patologías .....	68
III. La $I_{Kr}$ .....	68
III.a. Características de la $I_{Kr}$ .....	69
III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$ .....	70
III.c. La $I_{Kr}$ en diversas patologías .....	71
III.d. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv11.1 y MiRP1 .....	71
IV. La $I_{Ks}$ .....	73
IV.a. Características de la $I_{Ks}$ .....	73
IV.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$ .....	73
IV.c. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv7.1 y MinK .....	75
3. Fibrilación auricular .....	75
3.1. Génesis de la FA .....	77
3.1.1. Reentrada por múltiples ondas .....	78
3.1.2. Origen focal de la FA .....	79
3.1.3. Localización de los focos de FA .....	84

3.2. Causas y condiciones asociadas a la FA .....	86
3.3. Remodelado en la FA .....	88
3.3.1. Remodelado eléctrico .....	88
3.3.2. Remodelado estructural .....	92
3.3.2.a. Fibrosis auricular .....	94
3.3.2.b. Alteraciones en la expresión de conexinas .....	97
3.3.3. Remodelado mecánico .....	99
3.4. Tratamiento farmacológico de la FA .....	100
3.4.1. Tratamiento agudo .....	101
3.4.2. Tratamiento a largo plazo .....	104
3.4.3. Tratamiento antitrombótico .....	107
4. Control simpático de la función cardíaca .....	109
4.1. Sistema simpático cardíaco .....	109
4.2. Efectos de la estimulación $\beta$ -adrenérgica en el PA y en las corrientes iónicas auriculares .....	114
4.3. Estimulación $\beta$ -adrenérgica y fibrilación auricular .....	115
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>117</b>
<b>III. RESULTADOS .....</b>	<b>121</b>
1. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both .....	121
2. Chronic Atrial Fibrillation Up-regulates $\beta$ 1-adrenoceptors Affecting Repolarizing Currents and Action Potential Duration .....	149
<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>201</b>
1. Heterogeneidad eléctrica de los miocitos auriculares en condiciones fisiológicas .....	203
1.1. El componente sensible a dofetilida y 4-AP: la $I_{Kr}$ , la $I_{to1}$ y la $I_{Kur}$ .....	203
2. La FA crónica aumenta la heterogeneidad inter-auricular .....	204
2.1. Modificaciones producidas por la FA crónica sobre la $I_{Kr}$ , la $I_{to1}$ y la $I_{Kur}$ .....	205
2.2. ¿Qué aurícula es la más afectada por la FA crónica? .....	206
3. El componente sensible a 4-AP: la $I_{Ks}$ .....	207
3.1. Mutaciones en los genes de las subunidades que generan la $I_{Ks}$ .....	



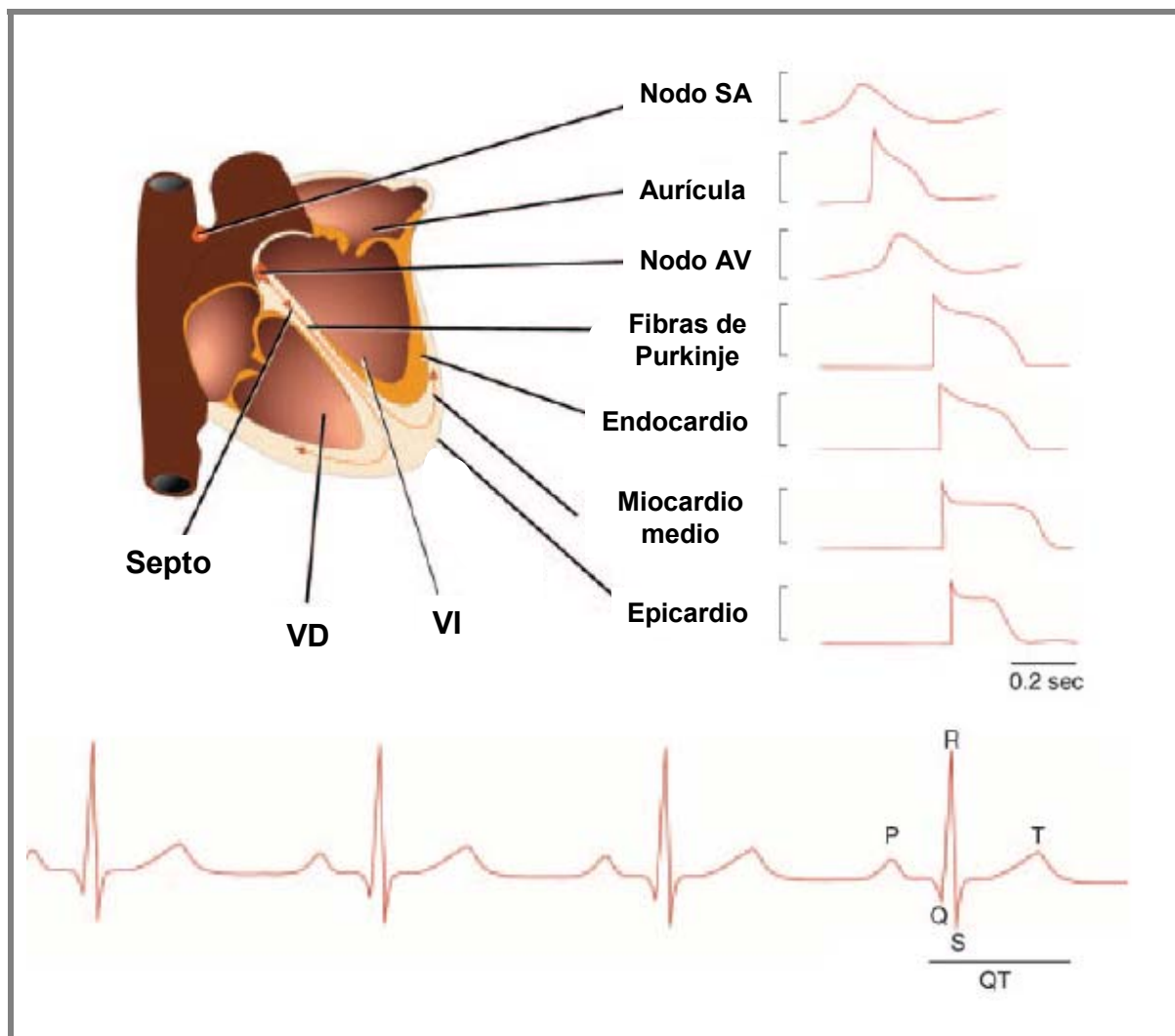
asociadas a FA familiar .....	210
4. Remodelado inducido por la FA crónica sobre la $I_{CaL}$ y la $I_{K1}$ .....	212
5. Remodelado de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos inducido por la FA crónica .....	213
5.1. Efecto de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos sobre las corrientes de $K^+$ repolarizantes voltaje-dependientes y sobre la $I_{K1}$ .....	215
5.2. Efecto de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la $I_{Ks}$ .....	216
5.3. Efecto de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la $I_{CaL}$ .....	218
6. Impacto funcional de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la DPA auricular .	218
6.1. Efectos de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos en los PAs registrados en miocitos de pacientes en RS .....	219
6.2. Efectos de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos en los PAs registrados en miocitos de pacientes con FA crónica .....	220
7. Limitaciones del estudio .....	222
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	<b>225</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>229</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDIACA

El corazón es un órgano que actúa a modo de bomba, enviando sangre a los distintos tejidos del organismo. Para llevar a cabo su función presenta tejidos especializados en los que se generan automáticamente impulsos que se conducen de forma organizada y provocan la contracción periódica del miocardio. El corazón está formado por dos tipos de músculo: el auricular y el ventricular, de los que depende su capacidad contráctil, y las fibras del tejido especializado de conducción, encargadas de la transmisión de los impulsos a través del corazón.



**Figura 1. Representación esquemática de la actividad eléctrica en el miocardio.** Se observan los potenciales de acción registrados en diversas zonas del tejido cardíaco y su correlación con el electrocardiograma de superficie. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco nace en el nodo senoauricular (SA), estructura que se localiza en la confluencia de la vena cava superior con la orejuela derecha y

la pared lateral de la aurícula derecha (Figura 1). El nodo SA genera unos 60-90 potenciales de acción (PA) por minuto que se propagan sin disminución de amplitud hasta que todas las células cardíacas son excitadas. Desde el nodo SA, el impulso se propaga por todo el tejido auricular a una velocidad de 0.3 m/s para, a continuación, llegar al nodo aurículo-ventricular (AV), única vía que permite la comunicación eléctrica entre aurículas y ventrículos en condiciones fisiológicas. En el nodo AV, el estímulo se ralentiza antes de pasar al ventrículo (0.01-0.05 m/s). El impulso pasa después a las fibras de transición y al sistema de His-Purkinje, a través del cual se conduce muy rápidamente (2-4 m/s). El haz de His se bifurca en una rama derecha y varias izquierdas, que acaban ramificándose profusamente en fibras de Purkinje, desde donde la activación se extiende por el músculo ventricular, empezando por el septo medio izquierdo y la base de los músculos papilares y, de ahí, al resto de los ventrículos. La rápida velocidad de conducción intraventricular (0.3-4 m/s) tiene como misión permitir que ambos ventrículos se contraigan de forma sincrónica en un corto espacio de tiempo, algo esencial para que se realice de forma eficaz la función de bomba (Hoffman y Cranefield, 1960; Delpón y Tamargo, 2010).

Para comprender este complejo mecanismo, que se repite con cada latido, es necesario conocer algunas propiedades de las células cardíacas tales como la excitabilidad, el automatismo, la refractariedad y la conducción del impulso cardíaco.

### 1.1. Excitabilidad

La membrana citoplásmica es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición. Esta diferencia en la composición de ambos medios origina un gradiente de concentración que induce la difusión de moléculas desde el medio donde están más concentradas hacia el medio en el que lo están menos (Tabla 1). Termodinámicamente, la difusión es un proceso que disminuye el orden del sistema (es decir, que aumenta su entropía), lo que implica que la difusión libera energía. Nernst cuantificó esta energía como una variación de potencial eléctrico:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (1)$$

donde  $\Delta G$  es la energía de Gibbs liberada en el proceso de difusión,  $R$  es la constante universal de los gases (8.31 J/mol·K),  $T$  es la temperatura absoluta y  $[ion]_e$  e  $[ion]_i$  son las concentraciones extra e intracelulares del ion que difunde.

Así, si la membrana es únicamente permeable al  $K^+$ , éste difundirá desde el interior (donde está más concentrado) hacia el exterior de la célula (donde está menos concentrado), por lo que el interior se tornará más negativo, con lo que volverá a atraer iones  $K^+$  hacia el interior de la célula. La energía de atracción también puede cuantificarse:

$$\Delta G = -E \cdot z \cdot F \quad (2)$$

donde  $E$  es el potencial transmembrana,  $z$  es la valencia del ion en cuestión y  $F$  es la constante de Faraday ( $9.65 \times 10^4$  C/mol). Con la salida progresiva de  $K^+$  de la célula, llega un punto en el que el gradiente eléctrico se iguala al gradiente químico (de concentración) que causa la difusión:

$$E \cdot z \cdot F = R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (3)$$

Reordenando los términos de la igualdad, se obtiene la “ecuación de Nernst” (Nernst, 1888):

$$E = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (4)$$

El potencial al que el flujo neto a través de la membrana de un ion es nulo recibe el nombre de “potencial de equilibrio” (Tabla 1) y su valor viene dado por la ecuación de Nernst.

Ion	[Ion] <sub>e</sub> (mM)	[Ion] <sub>i</sub> (mM)	Potencial de equilibrio
Na <sup>+</sup>	135-145	12	+67
K <sup>+</sup>	3.5-5	155	-96
Cl <sup>-</sup>	123	4.2	-90
Ca <sup>2+</sup>	1.5	10 <sup>-4</sup> nM	+129

**Tabla 1. Concentraciones extra e intracelulares de los principales iones en condiciones fisiológicas.** Los potenciales de equilibrio para cada ion se han obtenido mediante la ecuación de Nernst para una temperatura de 37°C.

La diferencia de potencial que existe a ambos lados de la membrana se denomina potencial de membrana ( $E_m$ ) y viene determinada por la concentración de iones a uno y a otro lado de la misma, así como por la permeabilidad de la membrana a cada ion (Hoffman y Cranefield, 1960). En condiciones normales, las células musculares auriculares y ventriculares presentan un  $E_m$  de aproximadamente -85 mV, mientras que en las células de los nodos SA y AV el  $E_m$  es de entre -45 y -65 mV. En las células auriculares y ventriculares el valor del  $E_m$  se mantiene constante si la célula no se estimula. A esta diferencia de potencial

se le denomina “potencial de reposo” (PR) y está determinado por el equilibrio entre la capacidad de los distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente de concentración y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente. Pero, además, algunas células como las nerviosas y las musculares son excitables: son capaces de variar esta diferencia de potencial generando impulsos eléctricos (o PA) en respuesta a un estímulo mediante el intercambio de iones entre los medios intra y extracelular. En el miocardio, estos impulsos se propagan para convertirse en el factor determinante de la contracción rítmica del corazón. El control del intercambio iónico resulta además esencial para evitar una excesiva presión osmótica debida a los cambios en la osmolaridad de ambos medios.

Si la membrana de las células cardíacas sólo fuera permeable al  $K^+$ , el  $E_m$  debería alcanzar un valor similar al del potencial de equilibrio para el  $K^+$  ( $E_K$ ). Sin embargo, el valor del  $E_m$  es menos negativo que el del  $E_K$  debido a que la membrana es además permeable a otros iones. Cuando una membrana es permeable a varios iones, el  $E_m$  depende de tres factores: la polaridad de la carga eléctrica de cada ion, la permeabilidad de la membrana ( $P_{ion}$ ) a cada ion y la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana. Por tanto, la ecuación que define el  $E_m$  en las células permeables al  $Na^+$ , al  $Cl^-$  y al  $K^+$ , denominada “ecuación de campo constante” o “ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz” (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), es:

$$E_m = \left( \frac{RT}{Fz} \right) \ln \left[ \frac{([K^+]_e P_K + [Na^+]_e P_{Na} + [Cl^-]_e P_{Cl})}{([K^+]_i P_K + [Na^+]_i P_{Na} + [Cl^-]_i P_{Cl})} \right] \quad (5)$$

donde  $P_K$ ,  $P_{Na}$  y  $P_{Cl}$  representan la permeabilidad de la membrana al  $K^+$ , al  $Na^+$  y al  $Cl^-$ , respectivamente.

### 1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular

En condiciones de reposo, el  $Na^+$  y el  $Ca^{2+}$  están más concentrados en el medio extracelular, mientras que el  $K^+$  y los aniones orgánicos son los que predominan en el medio intracelular. El transporte de iones a través de la membrana se produce a favor de gradiente de concentración (sin gasto de energía) o en contra de gradiente (y, por lo tanto, con gasto energético) y requiere de sistemas especializados de transporte como los canales iónicos o las proteínas transportadoras.

Los canales iónicos son proteínas transmembrana (TM) cuyas principales funciones son:

- Formar poros hidrófilos a través de los cuales los iones atraviesan la membrana a favor de gradiente de concentración y de potencial eléctrico (gradiente electroquímico), permitiendo el paso de iones masivamente (hasta  $10^8$  iones/s) y generando una corriente iónica.
- Discriminar los iones que pasan a su través, gracias a un filtro de selectividad. El mecanismo de selectividad se basa tanto en el tamaño del ion en su forma hidratada como en su carga, de modo que ciertos residuos del canal se alinean en el poro e interaccionan con los iones formando barreras termodinámicas que favorecen el paso de unos iones frente a otros.
- Controlar la permeabilidad de la membrana a cada ion mediante la transición entre los diferentes estados del canal. (abierto-conductor y cerrado e inactivo-no conductor). Los cambios conformacionales de la proteína entre los distintos estados son lo que se denomina el *gating* del canal y se producen de forma muy rápida ( $<10 \mu s$ ). Según el estímulo que origine estos cambios conformacionales, los canales se clasifican en canales dependientes de voltaje (dependen del  $E_m$ ), canales activados por ligando (el proceso de apertura y cierre depende de la unión de moduladores externos como hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (el *gating* está regulado por factores intracelulares como el  $Ca^{2+}$  o subunidades de proteínas G). En el caso de los canales dependientes de voltaje, la proteína presenta una serie de aminoácidos que se encuentran cargados a pH fisiológico y que se mueven en un campo eléctrico muy limitado y confinado en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando unas corrientes que se denominan corrientes de *gating* (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974) y cuya magnitud es muy pequeña, ya que en este proceso se produce un desplazamiento de carga equivalente al movimiento lineal de  $\approx 12-13$  electrones (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995).

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de pequeñas moléculas a través de la membrana. Estas proteínas sólo pueden fijar una o unas pocas moléculas al mismo tiempo para transferirlas al otro lado de la membrana, por lo que la velocidad de transporte es más lenta que la de los canales iónicos ( $10^2-10^4$  moléculas/s). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como las bombas iónicas o los cotransportadores:

- Las bombas iónicas son enzimas de membrana que utilizan la energía liberada en la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) para transportar iones a través de la membrana en contra de gradiente en un proceso denominado “transporte activo”. Debido a su mecanismo, se denominan ATPasas.
- Los cotransportadores o intercambiadores, al igual que las bombas iónicas, trasladan



moléculas en contra de su gradiente de concentración, aunque en este caso la energía que alimenta el proceso procede de la difusión de otras moléculas, normalmente iones  $\text{Na}^+$ . Si los iones  $\text{Na}^+$  se mueven en la misma dirección que la molécula transportada se habla de un cotransportador, mientras que si se mueven en dirección contraria se habla de un intercambiador. Posteriormente, las ATPasas se encargan de restaurar el gradiente de  $\text{Na}^+$ . Por este motivo, a este proceso se le denomina “transporte activo secundario”.

### 1.1.2. El Potencial de acción

Las células cardíacas son excitables, es decir, cuando reciben un estímulo de intensidad suficiente para superar el potencial umbral, generan una respuesta eléctrica o PA al que se acopla la respuesta cardíaca. Por el contrario, cuando no se alcanza el potencial umbral, sólo se genera una respuesta local que no se propaga a las células colindantes: es un estímulo “todo o nada”. El PA es un cambio transitorio en la polaridad de la membrana resultante de múltiples cambios secuenciales en la permeabilidad de la misma a los diferentes iones. La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, con lo que el interior de la célula va haciéndose más positivo (en su valor máximo, el potencial puede alcanzar valores cercanos a +40 mV), mientras que la salida de cargas positivas es responsable de la repolarización.

Parámetro	PA $\text{Na}^+$ -dependiente	PA $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente
Corriente despolarizante en la fase 0	$I_{\text{Na}}$	$I_{\text{Ca}}$
Potencial de reposo (mV)	-85 a -90	-45 a -65
Velocidad de conducción (m/s)	0.5-4	0.01-0.1
Amplitud del PA (mV)	100-130	40-85
Velocidad máxima de despolarización (mV/s)	200-1000	2-15
Factor de seguridad	Alto	Bajo
Se abole por	TTX, anestésicos locales, antiarrítmicos grupo I	Verapamilo, diltiazem, DHP, $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{La}^{3+}$

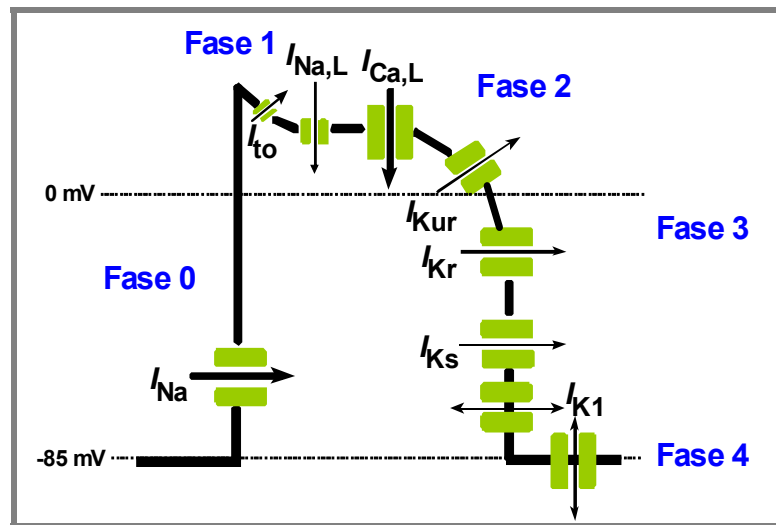
**Tabla 2. Características de los PA rápidos y lentos.** TTX: Tetrodotoxina. DHP: Dihidropiridinas.

En el corazón se registran PA de diversos tipos (Figura 1). En las células auriculares y ventriculares y en las células del sistema de His-Purkinje la despolarización es debida a la rápida entrada de iones de  $\text{Na}^+$ , mientras que en las células de los nodos SA y AV la despolarización es debida a la lenta entrada de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, en el corazón existen células que generan PA rápidos o “dependientes de  $\text{Na}^+$ ” y células que generan PA

lentos o “dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ” (Tabla 2) (Coraboeuf y Otsuka, 1956; Beeler y Reuter, 1977; Carmeliet y Vereecke, 1979).

#### 1.1.2.a. PA rápidos o dependientes de $\text{Na}^+$

Los PA rápidos o dependientes de  $\text{Na}^+$  presentan 5 fases (Figura 2) (Hoffman y Cranefield, 1960; Nattel, 2002; Delpón y Tamargo, 2010).



**Figura 2. PA auricular rápido o “dependiente de  $\text{Na}^+$ ”.** Representación esquemática de las distintas fases del PA, donde se representan las diversas corrientes iónicas de entrada y de salida implicadas en el mismo.

La fase 0 de rápida despolarización de las células miocárdicas se debe a la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje y, por lo tanto, a la activación de la corriente rápida de entrada de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ), que desplaza el potencial de membrana desde sus valores en reposo (PR  $\approx -85$  mV) hasta valores positivos ( $\approx +30$  mV). La activación de la  $I_{\text{Na}}$  es un proceso muy rápido (0.5-2 ms) y su inactivación sigue una cinética biexponencial, con un componente lento ( $I_{\text{Na,L}}$ ) que se prolonga durante varios cientos de ms y que contribuye al mantenimiento de la fase 2 del PA. La magnitud de la  $I_{\text{Na}}$  determina la amplitud, la velocidad máxima de despolarización del PA y, por lo tanto, la velocidad de conducción intracardíaca (Hondegheem, 1978; Walton y Fozzard, 1979; Hille, 2001). A continuación, comienza la repolarización celular, en la que se distinguen 3 fases.

La fase 1 de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la  $I_{\text{Na}}$  (paso del canal a una conformación no conductora) y de la activación de dos corrientes de salida de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje: a) la corriente transitoria ( $I_{\text{to}}$ ), que se activa e inactiva rápidamente y que juega un papel fundamental en el control de la duración del PA (DPA) sobre todo a nivel

auricular y del epicardio ventricular (Boyett, 1981; Josephson y cols., 1984; Giles e Imaizumi, 1988; Shibata y cols., 1989) y b) el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía, de rápida activación y lenta inactivación ( $I_{Kur}$ ), que es específicamente auricular (Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993).

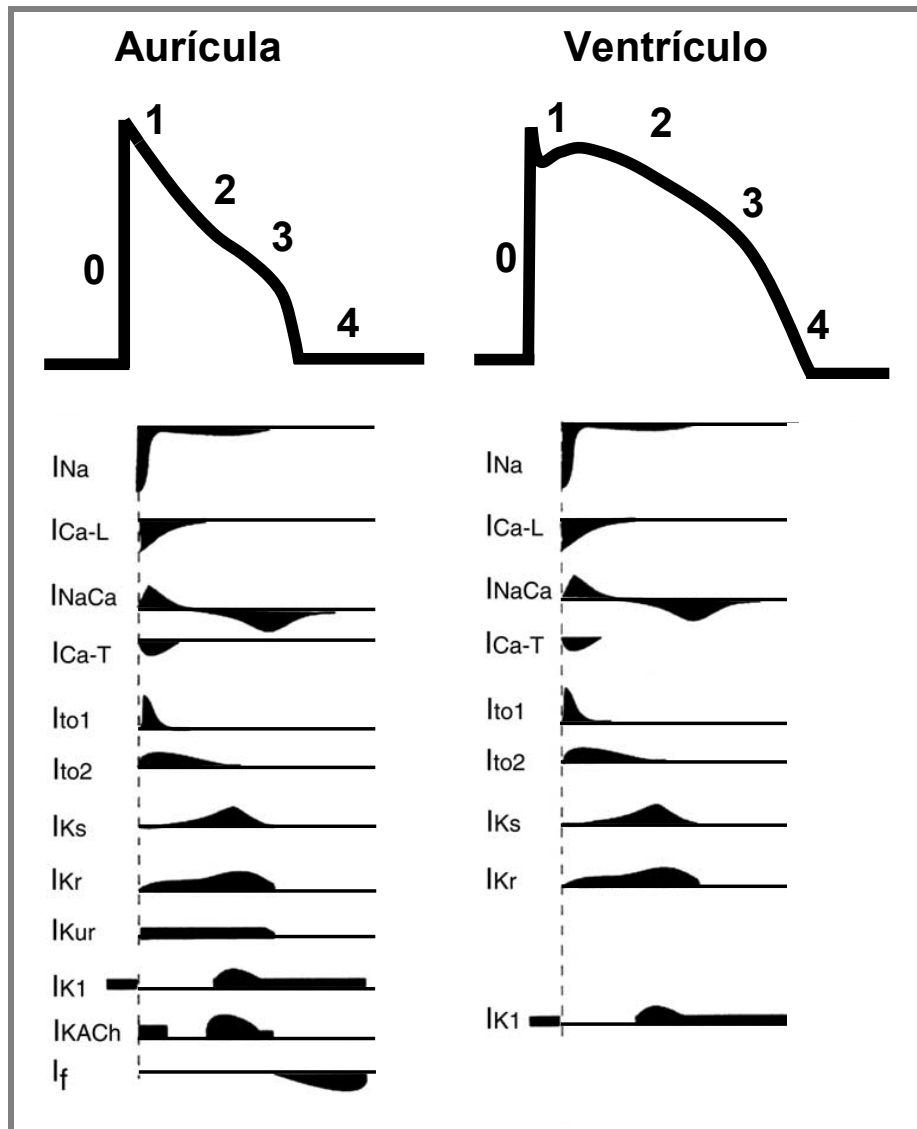
La fase 2 (o fase de meseta) representa el delicado equilibrio entre dos corrientes de entrada, la  $I_{Na,L}$  (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Gintant y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985) y la corriente de entrada de  $Ca^{2+}$  tipo L ( $I_{Ca,L}$ ) (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989; Bers y Pérez-Reyes, 1999), y tres corrientes rectificadoras tardías de salida de  $K^+$  de activación ultrarrápida, rápida y lenta ( $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$ , respectivamente) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991; Wang y cols., 1993 y 1994).

Durante la fase 3, la inactivación de las corrientes de entrada provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de  $K^+$  activadas durante la fase 2 y, como consecuencia, el  $E_m$  alcanza de nuevo el valor del PR. Además, durante esta fase se produce la salida de  $K^+$  a través de canales que presentan rectificación interna ( $I_{K1}$ ), lo que determina la fase final de la repolarización (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001). En las células auriculares, del sistema His-Purkinje y en los nodos SA y AV, la acetilcolina (ACh) y la adenosina se unen a sus respectivos receptores (muscarínico  $M_2$  y de adenosina  $A_1$ , ambos acoplados a proteínas  $G_i$ ) activando otra corriente que presenta rectificación interna, la corriente de  $K^+$  activada por ACh ( $I_{K,ACh}$ ) (Sakmann y cols., 1983). La activación de la  $I_{K,ACh}$  en las células auriculares hiperpolariza el  $E_m$  y acorta marcadamente la DPA (Shen y Kurachi, 1995; Pelleg y Belardinelli, 1993).

La fase 4 del PA se inicia una vez que el potencial de la célula alcanza de nuevo su valor de reposo y finaliza al comienzo del siguiente PA. En las células musculares auriculares y ventriculares esta fase es isoeletrica y, por lo tanto, el  $E_m$  se mantiene constante durante el periodo comprendido entre el final de un PA y el comienzo del siguiente. El mantenimiento del  $E_m$  en niveles constantes durante la fase 4 se debe principalmente a la  $I_{K1}$  (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), aunque también participan la activación de la ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX).

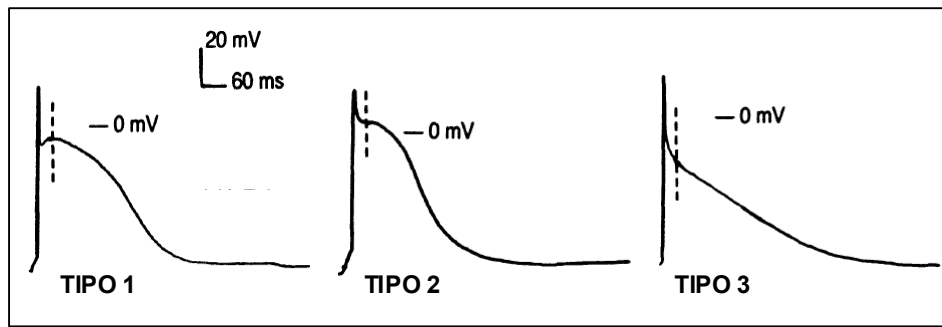
En la Figura 3 se muestran todas las corrientes implicadas en la génesis y en el mantenimiento del PA cardiaco en células auriculares y ventriculares. Al comparar la morfología de los PA auriculares y ventriculares se observa que la DPA es mayor en células ventriculares, lo que constituye un mecanismo protector que evita que las primeras puedan responder a frecuencias auriculares muy rápidas o a una estimulación prematura del corazón.

Dentro del tejido auricular y ventricular se han identificado diferencias en la morfología y en la DPA (Figuras 1 y 3), lo que ha sido atribuido a la diferencia de densidad y del tipo de canal iónico expresado.



**Figura 3.** Representación esquemática de PA auriculares y ventriculares con las respectivas corrientes iónicas que determinan su morfología. [Adaptada de Roberts, 2006]

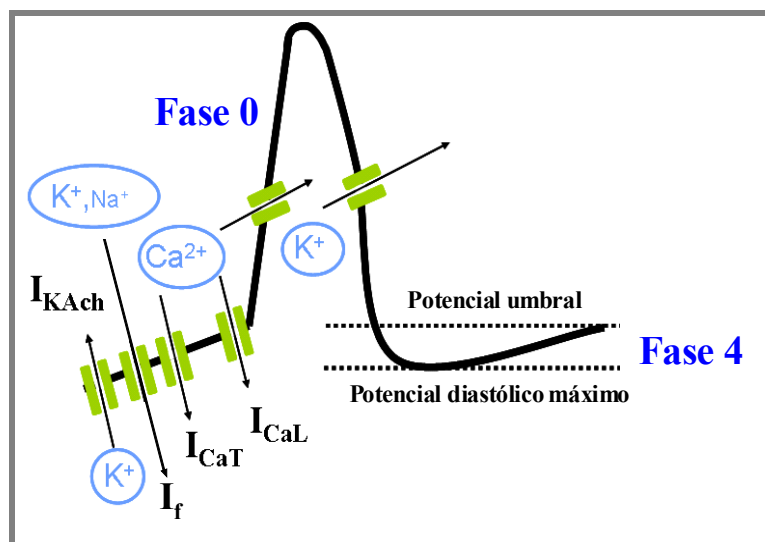
Clásicamente, al menos dos tipos de PA han sido registrados en preparaciones de aurícula derecha AD humana: uno con un pico prominente de repolarización rápida, seguido por una meseta y otro sin pico, y con una fase de meseta de mayor duración (Trautwein y cols., 1962; Gelband y cols., 1972). Más recientemente, se han identificado 3 tipos celulares en AD humana en cuanto a la morfología de su PA. Las distintas morfologías se han asociado a diferencias en las corrientes de  $K^+$  implicadas en la repolarización. (Figura 4) (Wang y cols., 1993).



**Figura 4.** Caracterización de tres tipos de PA registrados en miocitos auriculares humanos. [Adaptada de Wang y cols., 1993].

#### 1.1.2.b. PA lentos o dependientes de $\text{Ca}^{2+}$

Los PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se generan en las células de los nodos SA y AV, cuyo PR es de  $\approx -55$  mV) (Figura 5). A este potencial, la  $I_{\text{Na}}$  está totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los PA en estas células se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. También se generan PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y en células anormalmente despolarizadas (Reuter, 1973; Cranefield y Aronson, 1975).



**Figura 5.** PA lento o “dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ”. Representación esquemática de las distintas fases del PA, donde se representan las diversas corrientes iónicas de entrada y de salida implicadas en el mismo.

La activación de la  $I_{\text{Ca,L}}$  es mucho más lenta que la de la  $I_{\text{Na}}$ , por lo que la amplitud de los PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  es menor ( $\approx 70$ - $80$  mV) y su propagación mucho más lenta ( $0,02$ - $0,05$  m/s), lo que explica su denominación de PA lentos (Isenberg y Klockner, 1982; Noble, 1984). La fase 2 (de meseta) se debe a un equilibrio entre la inactivación de la  $I_{\text{Ca,L}}$  y la

activación de la  $I_{Kr}$ , y la fase 3 (de rápida repolarización) se debe a la activación de las corrientes de  $K^+$  rectificadoras tardías.

## 1.2. Automatismo

Aunque todos los miocitos cardiacos son excitables y responden a los estímulos eléctricos generando PA, algunos, además, presentan actividad automática intrínseca, es decir, son capaces de generar PA de forma espontánea. En condiciones fisiológicas, las células de los nodos SA y AV, de los tractos internodales auriculares y del sistema especializado de conducción His-Purkinje presentan actividad automática, careciendo de ella las células musculares auriculares y ventriculares (Hoffman y Cranefield, 1960). Los PA generados en estas estructuras presentan una fase 4 de lenta despolarización diastólica que desplaza el nivel del  $E_m$  hasta el nivel de potencial umbral y cuando éste se alcanza, se genera un nuevo PA propagado. La frecuencia de disparo de una célula automática depende del potencial diastólico máximo, del nivel de potencial umbral y de la pendiente de la fase 4 de lenta despolarización diastólica (Figura 5).

Una característica de las células automáticas dependientes de  $Na^+$  es que cuando son estimuladas a una frecuencia mayor a la suya, tanto la inclinación de la fase 4 como la frecuencia de disparo disminuyen. Esta característica se denomina “supresión por sobreestimulación” (Hoffman y Cranefield, 1960). En condiciones fisiológicas, las células del nodo SA generan PA a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/min frente a  $\approx 15$  latidos/min), por lo que actúan como marcapasos dominante y determinan la frecuencia cardíaca, mientras que las demás células automáticas actúan como “marcapasos latentes o subsidiarios”.

El mecanismo responsable de la fase 4 de lenta despolarización diastólica varía en los distintos tejidos cardíacos automáticos. En las células del sistema His-Purkinje esta fase se debe a la activación mantenida de la corriente hiperpolarizante marcapasos o “*funny current*” ( $I_f$ ), una corriente de entrada de  $Na^+$  y  $K^+$  generada a través de canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos (canales HCN, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*), y a la reducción de la  $I_K$  previamente activada durante la fase 3 del PA. La  $I_f$  se activa durante la fase 3 cuando el  $E_m$  se hace más negativo de -50 mV (DiFrancesco, 2006; Baruscotti y cols., 2010). En las células de los nodos SA y AV, cuando el  $E_m$  alcanza valores de -50 mV se activa, además de la  $I_f$ , la corriente de entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales tipo T ( $I_{Ca,T}$ ), lo que acelera la fase final de la despolarización diastólica

(Irisawa y Hagiwara, 1988). Finalmente, cuando se alcanza el potencial umbral, se activa la  $I_{Ca,L}$ , que es la corriente responsable de la fase 0 del PA en estas células.

### 1.3. Refractoriedad

Desde hace más de 150 años se sabe que el corazón requiere cierto tiempo para recuperar la excitabilidad tras un primer estímulo, tiempo que se conoce como “periodo refractario” (Bowditch, 1871).

En las células que generan PA dependientes de  $Na^+$ , el periodo refractario viene determinado por la cinética de reactivación de la  $I_{Na}$ . Los canales de  $Na^+$  permanecen en estado de reposo durante la diástole (fase 4), se abren durante la fase 0 del PA y, a continuación, pasan a un estado inactivo no conductor en el que permanecen hasta que la repolarización alcanza valores más negativos de -50 mV. Dado que el estado inactivo no permite la entrada de  $Na^+$ , la aplicación de un estímulo durante las fases 1 y 2 y el comienzo de la fase 3 es incapaz de generar una respuesta propagada. Al periodo de tiempo durante el que la célula cardíaca es incapaz de generar un PA y permanece inexcitable se le denomina “periodo refractario absoluto” (Weidmann, 1955; Hoffman y Cranefield, 1960; Hondeghem y Katzung, 1977). Conforme el  $E_m$  se repolariza entre -50 y -90 mV, cierta proporción de los canales de  $Na^+$  pasan del estado inactivo al estado de reposo y, por lo tanto, la aplicación de un estímulo eléctrico es capaz de generar una respuesta. Esta respuesta tendrá menor amplitud y se conducirá más lentamente. Por lo tanto, existe un periodo de tiempo durante el cual la célula es excitable, pero en el que aún no ha recuperado la excitabilidad completamente. Durante este periodo de tiempo, denominado “periodo refractario efectivo”, un estímulo supraumbral puede producir una respuesta local, pero no un PA propagado (Hoffman y Cranefield, 1960). Al periodo refractario efectivo le sigue otro periodo de tiempo durante el cual un estímulo es capaz de inducir la génesis de un PA propagado, denominado “periodo refractario relativo”. A este nivel, la  $I_{Na}$  todavía no se ha reactivado por completo, por lo que si en este momento se genera un PA prematuro, éste va a presentar menor amplitud y una duración más corta que un PA generado cuando la célula se ha repolarizado y recuperado por completo su excitabilidad. La duración del periodo refractario cardíaco determina la máxima frecuencia de estimulación cardíaca y varía con la DPA. Las células auriculares presentan una menor duración del PA y del periodo refractario que las ventriculares ( $\approx 200$  ms en las primeras frente a los  $\approx 300$  ms de las segundas), lo que explica por qué la frecuencia de las

arritmias supraventriculares es mayor que la de las ventriculares. El periodo refractario protege al corazón de aquellas situaciones en las que la frecuencia es muy rápida, y en las que, por tanto, se impide la relajación completa del músculo cardíaco, disminuyendo su función de bomba.

En los nodos SA y AV, la fase 0 del PA es debida a la activación de la  $I_{Ca,L}$ , corriente que presenta una constante de tiempo de reactivación de entre 100 y 300 ms (Gettes y Reuter, 1974; Bers y Pérez-Reyes, 1999). Por ello, no es posible generar un nuevo PA propagado incluso hasta después de que la célula se haya repolarizado por completo, es decir, que el periodo refractario efectivo se prolonga más allá de la DPA. A este fenómeno se le denomina “refractariedad posrepolarización” (Trautwein y Uchizono, 1963).

#### 1.4. Propagación del impulso cardíaco

La propagación del impulso cardíaco es un fenómeno complejo que depende no sólo del tipo, tamaño, orientación y geometría de las células cardíacas, sino también de las propiedades activas y pasivas de la membrana. Las propiedades activas están determinadas por los mecanismos iónicos dependientes de voltaje y de tiempo que controlan la excitabilidad y la refractariedad. Por otro lado, la conducción del impulso cardíaco dependerá del acoplamiento intercelular y de las propiedades de cable de la membrana (resistencia y capacitancia), esto es, de las propiedades pasivas de la membrana.

Biofísicamente, la membrana es un elemento dieléctrico que aísla dos medios conductores. Sin embargo, este aislamiento no es perfecto, ya que existen mecanismos de transporte de iones, por lo que la resistencia al paso de cargas que ofrece la membrana ante una diferencia de potencial es finita y medible. Además, el dieléctrico (en este caso, los fosfolípidos de la membrana) que aísla los medios extra e intracelular está sometido a una diferencia de potencial en la membrana, por lo que atrae cargas a las proximidades de la membrana (los aniones del citosol serán atraídos por el exterior positivo y los cationes del medio extracelular son atraídos por el interior negativo). En estas condiciones, la membrana está acumulando carga según la ecuación:

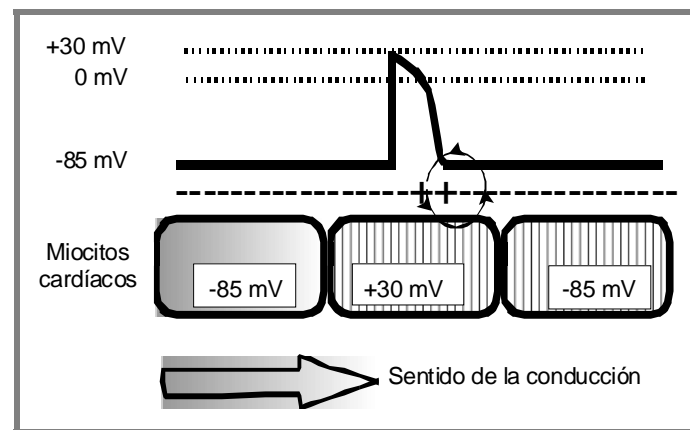
$$Q = E_m \cdot C_m \quad (6)$$

donde  $Q$  es la carga acumulada y  $C_m$  la capacitancia de la membrana, que depende de las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica y de la geometría de la membrana. La  $C_m$



impone un retraso en la variación del voltaje y en la propagación del estímulo, ya que cualquier variación en el  $E_m$  debe vencer primero la carga acumulada en la membrana.

Los miocitos cardíacos están unidos entre sí por los discos intercalares, que permiten el acoplamiento eléctrico, y por los desmosomas, uniones especializadas que facilitan el acoplamiento contráctil. Estas uniones permiten que el miocardio funcione como un sincitio funcional. Este acoplamiento se realiza a través de uniones de baja resistencia ( $1-3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , unas 700 veces menor que la de la resistencia externa de la membrana), a las que se denomina “uniones estrechas” (*gap junctions*). En condiciones fisiológicas, la resistencia longitudinal o intracelular, determinada por las uniones estrechas y el citoplasma, es mínima, lo que permite un acoplamiento célula-célula que facilita la propagación sincrónica del impulso cardíaco.



**Figura 6. Representación esquemática de la propagación del impulso cardíaco**

El impulso cardíaco se genera en el nodo SA y se propaga de forma electrotónica a las células excitables vecinas, desplazando su nivel de  $E_m$  hasta el nivel de potencial de membrana de la célula vecina ya excitada. Cuando esto sucede, se genera un nuevo PA, que a su vez despolarizará electrotónicamente las células vecinas hasta el nivel de potencial umbral produciendo la génesis de un nuevo PA y así sucesivamente (Figura 6). La capacidad del PA propagado para desplazar el PR de una célula adyacente hasta el potencial umbral y generar un nuevo PA se denomina “factor de seguridad”. Cuanto mayor sea la amplitud de la  $I_{Na}$  que genera el PA, mayor será la velocidad de conducción con que éste se conducirá por el miocardio y, por lo tanto, mayor será el factor de seguridad de propagación del impulso cardíaco. Por el contrario, en todas aquellas situaciones en las que la  $I_{Na}$  esté parcialmente inhibida, en aquellas células que generen PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , o tras la estimulación prematura, el factor de seguridad de propagación del impulso será menor (Delpón y Tamargo, 2010). El bloqueo de la conducción en cualquiera de estas situaciones propicia la

aparición de arritmias por reentrada.

Una vez que los impulsos salen del nodo SA, se propagan con rapidez a toda la aurícula, produciendo la sístole auricular. A su paso a través del nodo AV, la propagación se ralentiza, lo que permite que la contracción auricular impulse la sangre hacia los ventrículos, optimizando el gasto cardíaco y reduciendo la posibilidad de que queden remanentes sanguíneos en la aurícula. Una vez que los impulsos salen del nodo AV, entran en el sistema de conducción, donde la propagación es más rápida, permitiendo finalmente la contracción ventricular coordinada.

La actividad eléctrica cardíaca tiene su reflejo en el electrocardiograma (ECG), existiendo una relación entre los intervalos del ECG y las secuencias de activación y repolarización. La activación auricular (fase 0 de los PAs) corresponde a la onda P, y la ventricular, al complejo QRS, cuya duración es inversamente proporcional a la velocidad de conducción intraventricular. El intervalo PR refleja el tiempo de conducción a través del nodo AV, el haz de His y sus ramas, y se prolonga cuando disminuye la velocidad de conducción en dichas estructuras. La duración del intervalo QT refleja el tiempo de repolarización ventricular (Figura 1).

## **2. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADOS EN EL PA CARDÍACO**

### **2.1. Canales de $\text{Na}^+$**

Los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje son fundamentales en la génesis y propagación de la señal eléctrica en tejidos excitables como el corazón, el músculo esquelético o el sistema nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952a y b; Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; George, 2005).

El canal de  $\text{Na}^+$  presenta, al menos, tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo. Durante la diástole, el canal se encuentra en estado de reposo y la probabilidad de que se abra es extremadamente baja. La despolarización de la membrana produce un cambio conformacional en la estructura del canal que causa su apertura durante 1-2 ms, generándose una corriente rápida de entrada de  $\text{Na}^+$ . A continuación, el canal se inactiva rápidamente, lo que produce el cese de la entrada de  $\text{Na}^+$  (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003). El paso desde

el estado inactivo hasta el estado de reposo se denomina “reactivación del canal” y es un proceso necesario para que el canal pueda volver a abrirse. En situación fisiológica, esta transición tiene lugar durante los primeros 50-100 ms de la diástole por lo que, considerando que en ritmo sinusal (RS) el intervalo diastólico es de entre 500 y 700 ms, cuando llega el siguiente latido la mayoría de los canales ya están en estado de reposo y, por lo tanto, preparados para volver a abrirse (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003). Además, el canal de  $\text{Na}^+$  es la diana farmacológica de los anestésicos locales y de los fármacos antiarrítmicos del grupo I que, a las concentraciones empleadas en terapéutica, se unen con mayor afinidad a los estados abierto e inactivo del mismo (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).

### 2.1.1. Estructura de los canales de $\text{Na}^+$

Los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad conductora  $\alpha$  (de la que se han caracterizado 12 isoformas) y una o varias subunidades accesorias  $\beta$  ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) (Figura 7 y Tabla 3) (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005a; George, 2005; Abriel, 2010).

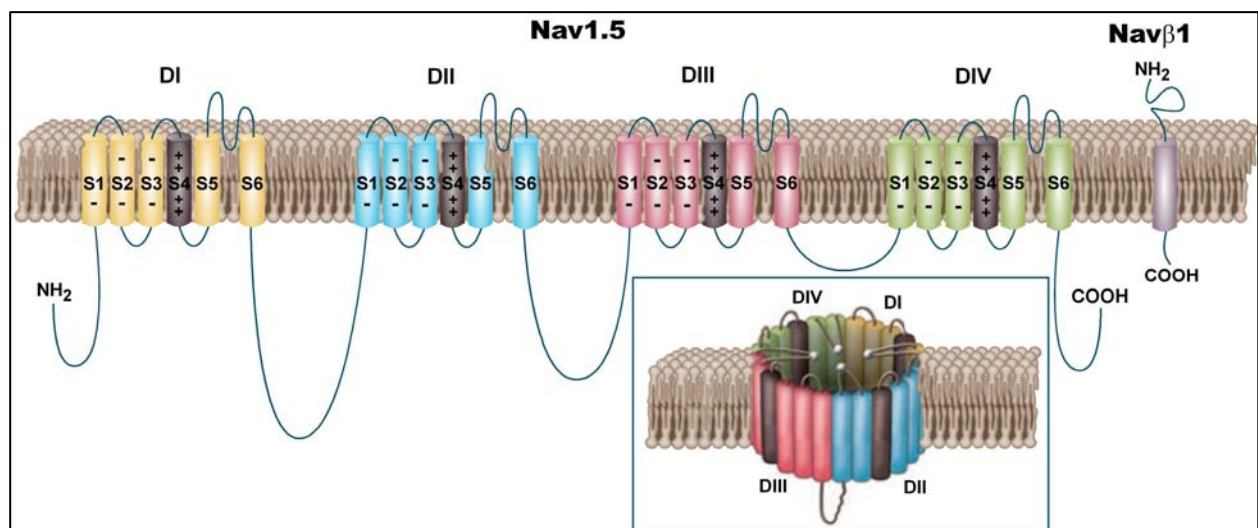
Subunidad $\alpha$				Subunidad $\beta$			
Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido	Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido
SCN1A	Nav1.1* ( $\alpha_1$ )	2q24	SNC	SCN1B	Nav $\beta$ 1.1* ( $\beta_1$ )	19q11	SNC
SCN2A	Nav1.2 ( $\alpha_2$ )	2q23	SNC	SCN2B	Nav $\beta$ 2.1* ( $\beta_2$ )	11q24	SNC
SCN3A	Nav1.3* ( $\alpha_3$ )	2q24	SNC	SCN3B	Nav $\beta$ 3.1* ( $\beta_3$ )	11q26	SNC
SCN4A	Nav1.4* ( $\alpha_4$ )	17q21	ME	SCN4B	Nav $\beta$ 4.1 ( $\beta_4$ )	11q24	SNC
SCN5A	Nav1.5* ( $\alpha_5$ )	3p21	MC				
SCN6A	Nav2.1* ( $\alpha_6$ )	2q21-23	Útero				
SCN7A	$\alpha_7$	2q36-37	SNC				
SCN8A	Nav1.6* ( $\alpha_8$ )	2q13	SNC				
SCN9A	Nav1.7	2q24	T				
SCN10A	Nav1.8	3p22	SNP				
SCN11A	Nav1.9	3p21	SNC				
SCN12A		3p23-21.3	SNC				

**Tabla 3. Subunidades que forman el canal de  $\text{Na}^+$  en el hombre.** \*Subunidades que se expresan en el corazón. MC: Músculo cardíaco. ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. T: Tiroides. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

- Subunidad  $\alpha$

Las subunidades  $\alpha$  de los canales de  $\text{Na}^+$  pertenecen a una pequeña familia de proteínas con una secuencia aminoacídica altamente conservada que se expresan en diferentes tejidos y que codifican canales cuyas propiedades no son idénticas (Goldin, 2002).

El gen SCN5A codifica la subunidad  $\alpha$  Nav1.5, responsable de la  $I_{\text{Na}}$  cardíaca. Esta subunidad está formada por 4 dominios homólogos (DI a DIV), con 6 segmentos TM dispuestos en  $\alpha$ -hélice cada uno (S1 a S6). Los segmentos de cada dominio se conectan mediante secuencias hidrofílicas no conservadas. El lazo que une los segmentos S5 y S6, denominado “lazo P”, es extracelular y forma parte del poro iónico. Los extremos carboxilo- y amino-terminal (C- y N-terminal, respectivamente) y los lazos de unión entre los diferentes dominios son intracelulares (Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003) (Figura 7)



**Figura 7. Estructura del canal de  $\text{Na}^+$ .** Esquema de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de  $\text{Na}^+$ . En la subunidad  $\alpha$ , se indica el sensor de voltaje, el filtro de selectividad y los diferentes dominios (DI a DIV). En el recuadro inferior se muestra la estructura del canal plegado en la conformación que adopta en la membrana. [Adaptada de Meisler y Kearney, 2005]

En la membrana la proteína del canal de  $\text{Na}^+$  orienta sus cuatro dominios de forma simétrica de manera que los S5 y S6 junto con los lazos P forman las paredes del poro hidrófilo. Los S1-S4 de los cuatro dominios quedan apartados del poro, rodeados por los fosfolípidos de la membrana. Clásicamente se ha considerado que el S4 queda, a su vez, rodeado por el resto de segmentos TM (Figura 7). La mayor parte de los residuos que forman los S5 y S6 de los 4 dominios son hidrófobos. Por su parte, los S4 presentan un residuo cargado (Arg o Lys) cada tres aminoácidos, formando una hélice de cargas positivas en la membrana. En total, 22 aminoácidos cargados positivamente (cuatro cargas positivas en el DI, cinco en los DII y DIII

y ocho en el DIV) que aparecen conservados en todas las isoformas del canal de  $\text{Na}^+$  y que actúan como “sensor de voltaje” (Stühmer y cols., 1989). La teoría más aceptada acerca del sensor de voltaje es que los S4 se mueven físicamente a través de la membrana desde el interior hacia el exterior en respuesta a la despolarización, exponiendo al exterior dos cargas positivas que se encontraban previamente ocultas en el interior de la membrana (Yang y cols., 1996; Bezanilla, 2000 y 2002). Cuatro de los residuos presentes en los lazos P forman un anillo que se denomina “locus DEKA”: Asp en DI, Glu en DII, Lys en DIII y Ala en DIV. Esta estructura determina la conductancia y la selectividad iónica del canal al  $\text{Na}^+$ , así como la unión de toxinas (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991). La sustitución de estos cuatro aminoácidos por residuos de Glu (que son los aminoácidos presentes en las posiciones análogas en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ ) convierte los canales de  $\text{Na}^+$  en selectivos para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Heinemann y cols., 1992).

- Subunidades auxiliares

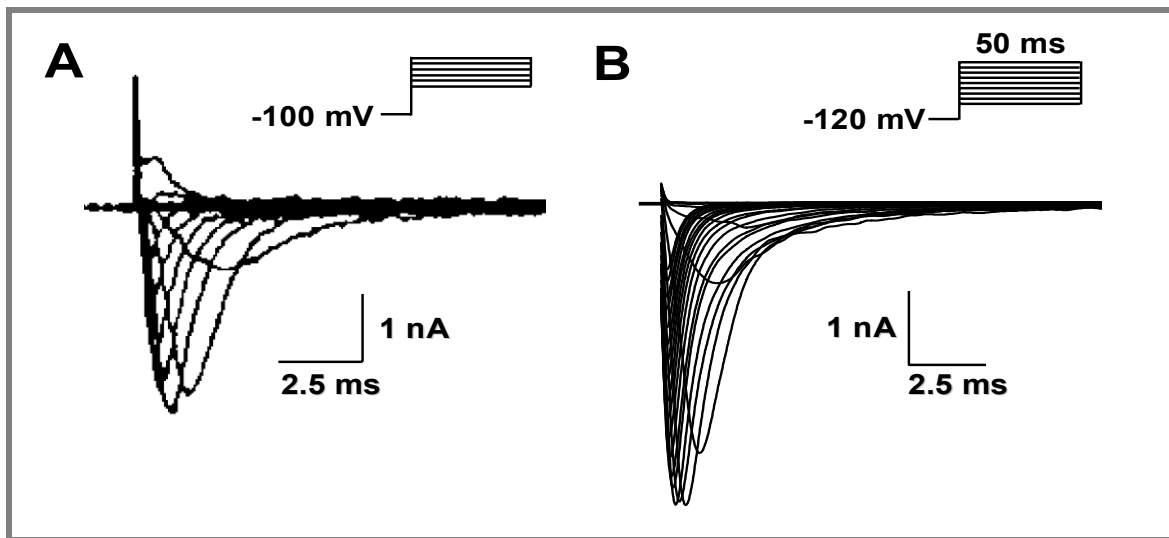
Las principales subunidades reguladoras del canal de  $\text{Na}^+$  son las subunidades  $\beta$ , de las que en la actualidad se conocen 4 isoformas ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) (Tabla 3) (Morgan y cols., 2000; Goldin, 2002). Son proteínas con un único dominio TM, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular y presentan una secuencia tipo inmunoglobulina que las diferencia del resto de subunidades accesorias (Isom y Catterall, 1996). Estas subunidades no forman parte del poro conductor del canal, pero regulan el *gating* del mismo, su expresión en la membrana y la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto (Isom y Catterall, 1996).

Su implicación en la regulación del canal de  $\text{Na}^+$  cardíaco no está clara todavía, aunque mutaciones en cada una de las cuatro subunidades auxiliares han sido relacionadas con diferentes síndromes arritmogénicos (Abriel, 2010). Además, la presencia de la subunidad Nav $\beta$ 1.1 disminuye la afinidad de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos del grupo I por la subunidad  $\alpha$  Nav1.5 (Balser y cols., 1996; Makielski y cols., 1996; Balser, 2001).

### 2.1.2. Características de la $I_{\text{Na}}$

La  $I_{\text{Na}}$  es la responsable de la fase 0 de los PA generados en las células musculares auriculares y ventriculares y en el sistema de His-Purkinje (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985). La despolarización inicia un cambio conformacional que produce la apertura del

canal de  $\text{Na}^+$  (Hirschberg y cols., 1995; Yang y Horn, 1995). La  $I_{\text{Na}}$  alcanza un pico máximo en 0.5-2 ms, y, a continuación, se inactiva de forma rápida (Figura 8). El umbral de activación de la corriente se encuentra en -60 mV y alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV (Hodgkin y Huxley, 1952a y b; Armstrong, 1981). La inactivación no sólo cierra el canal, sino que impide la reapertura del mismo hasta que haya pasado el tiempo suficiente para su recuperación, determinando así la frecuencia máxima de excitación celular y preservando el gradiente iónico intracelular, lo que impide la muerte celular.



**Figura 8. Registros de  $I_{\text{Na}}$ .** (A) Trazos de  $I_{\text{Na}}$  registrados en miocitos ventriculares humanos tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -60 y +70 mV desde un potencial de fijación de -100 mV. (B)  $I_{\text{Na}}$  registrada en nuestro laboratorio en células CHO transfectadas de forma transitoria con la subunidad  $\alpha$  Nav1.5 y la subunidad  $\beta$ 1 tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales desde -80 hasta +70 mV desde un potencial de fijación de -120 mV [Adaptada de Müller-Ehmsen y cols., 1999 (A)]

La inactivación de la  $I_{\text{Na}}$  cardíaca sigue un proceso biexponencial, presentando un componente rápido y uno lento (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Balser, 2001). La rapidez de la activación y la inactivación sugiere que ambos procesos podrían estar acoplados (Aldrich y cols., 1983; Catterall, 2000; Balser, 2001; Ulbricht, 2005). Incluso, el canal puede pasar al estado inactivo sin haber pasado por el estado abierto (“inactivación del estado cerrado”) (Horn y cols., 1981). Se ha demostrado que la “inactivación rápida” depende de tres residuos hidrofóbicos presentes en el lazo DIII-DIV, la “secuencia IFM” (Ile1488, Phe1489 y Met1490) (Eaholtz y cols., 1994). Además, el extremo C-terminal participa en la estabilización de esta inactivación, disminuyendo la probabilidad de reapertura (Mantegazza y cols., 2001; Cormier y cols., 2002; Motoike y cols., 2004). La “inactivación lenta” es un proceso que se prolonga durante varios cientos de ms y que es responsable del control de la entrada de  $\text{Na}^+$  durante la fase de meseta del PA cardíaco,

contribuyendo de este modo al mantenimiento de dicha fase (Clarkson y cols., 1984; Carmeliet, 1987; Fozzard y cols., 1987; Balser, 2001). La inactivación lenta disminuye al aumentar la concentración extracelular de  $\text{Na}^+$  (Oxford y Yeh, 1985) y parece estar regulada por un complicado mecanismo en el que están involucrados los cuatro dominios del canal (O'Reilly y cols., 1999; Vilin y cols., 1999).

### 2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de $\text{Na}^+$ cardíacos

La importancia de los canales de  $\text{Na}^+$  se pone de manifiesto por la existencia de diferentes enfermedades causadas por mutaciones en los genes que los codifican, y que afectan a la función nerviosa o a la del músculo esquelético y/o cardíaco (Cannon y cols., 1991; Wallace y cols., 1998; George, 2005; Zimmer y Surber 2008; Abriel, 2010).

A nivel cardíaco, las mutaciones en el gen que codifica la subunidad Nav1.5 (SCN5A) se han relacionado con la aparición de arritmias ventriculares en pacientes con síndrome de QT largo (SQTL) tipo 3, síndrome de Brugada (SB) tipo 1, fibrilación auricular (FA) familiar tipo 3, defectos en la conducción intracardíaca, síndrome del nodo enfermo, síndrome de repolarización temprana (SRT) tipo 6 y muerte súbita en recién nacidos (Wang y cols., 1995a; Chen y cols., 1998; Schott y cols., 1999; Wei y cols., 1999; Schwartz y cols., 2000; Veldkamp y cols., 2000; Tan y cols., 2001; Grant y cols., 2002; Darbar y cols., 2008; Amin y cols., 2010; Wilde y Brugada, 2011 ). Mutaciones en los genes que codifican las subunidades  $\beta_1$  (SCNB1),  $\beta_3$  (SCNB3) y  $\beta_4$  (SCNB4) están implicadas en el SB tipo 5 y tipo 7 y en el SQTL tipo 10, respectivamente (Cerrone y Priori, 2011).

## 2.2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la despolarización de la membrana y son esenciales para acoplar las señales eléctricas en la superficie celular con la respuesta fisiológica a nivel celular (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989). Inicialmente, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje se clasificaron según la magnitud de la despolarización requerida para su activación: los que requerían una fuerte despolarización (HVA, *High Voltage Activated*) y los que requerían una despolarización menor (LVA, *Low Voltage Activated*). Los canales LVA son los que hoy en día se conocen como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, que se activan rápidamente a  $E_m \approx -50$  mV y que se inactivan

también rápidamente (Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Los canales HVA se abren cuando se despolariza la membrana hasta  $\approx -30$  mV y su inactivación puede prolongarse hasta 100 ms. Estos canales presentan diferentes propiedades cinéticas, biofísicas y farmacológicas y, hasta el momento, se han identificado 5 subtipos (L, N, P, Q y R). Sin embargo, en el miocardio humano sólo se ha demostrado la presencia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y tipo T.

Los canales tipo L se localizan principalmente en los túbulos T de la membrana, próximos y enfrentados a los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico (RyR2). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L promueve la apertura de los RyR2 con la consiguiente salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el mismo. Es decir, que la  $I_{\text{CaL}}$  provoca la “liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ” y con ello dispara la respuesta contráctil de los miocitos cardiacos. A su vez, la  $I_{\text{CaL}}$  determina a nivel eléctrico la fase de meseta del PA. Por su parte, los canales tipo T se localizan principalmente en las células auriculares y en las células del nodo SA y en las fibras de Purkinje, mientras que su presencia en las células ventriculares es mínima (Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Yuan y cols., 1996).

### 2.2.1. Estructura de los canales de $\text{Ca}^{2+}$

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje son heterotetrámeros compuestos por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ , y, en algunos tejidos, la subunidad  $\gamma$  (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Hasta ahora, se han identificado los genes que codifican la expresión de 10 subunidades  $\alpha_1$  (Catterall y cols., 2005b), 4 subunidades  $\beta$ , 4 complejos  $\alpha_2/\delta$  y 8 subunidades  $\gamma$  (Tabla 4), aunque, a nivel cardíaco, sólo se ha demostrado la existencia de las subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ . Los diferentes tipos de corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) se definen en función de la subunidad  $\alpha_1$  que forma el canal, mientras que las subunidades reguladoras  $\alpha_2/\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  modulan su tráfico a la membrana y/o las propiedades biofísicas de la corriente (Figura 9) (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005).





Subunidad $\alpha_1$					Subunidades $\beta$ reguladoras			
	Proteína	Gen	Cromosoma	$I_{Ca}$	Proteína	Gen	Cromosoma	
Cav $\alpha$ 1	Cav1.1 ( $\alpha_{1S}$ )	CACNA1S	1q31-32	L	Cav $\beta$	$\beta_1$	CACNB1	17q11.2
	Cav1.2* ( $\alpha_{1C}$ )	CACNA1C	12p13.3	L		$\beta_2^*$	CACNB2	10p12
	Cav1.3 ( $\alpha_{1D}$ )	CACNA1D	3p14.3	L		$\beta_3$	CACNB3	12q12
	Cav1.4 ( $\alpha_{1F}$ )	CACNA1F	Xp11.23	L		$\beta_4$	CACNB4	2q23
Cav $\alpha$ 2	Cav2.1 ( $\alpha_{1A}$ ) Cav2.2 ( $\alpha_{1B}$ ) Cav2.3* ( $\alpha_{1E}$ )	CACNA1A	19p13	P/Q	Cav $\alpha_2$ / $\delta$	$\alpha_2/\delta_1^*$	CACNA2D1	7q11.2
		CACNA1B	9q34	N		$\alpha_2/\delta_2^*$	CACNA2D2	3p14
		CACNA1E	1q25-31	R		$\alpha_2/\delta_3$	CACNA2D3	3p13
						$\alpha_2/\delta_4$	CACNA2D4	12p13
Cav $\alpha$ 3	Cav3.1* ( $\alpha_{1G}$ ) Cav3.2* ( $\alpha_{1H}$ ) Cav3.3 ( $\alpha_{1I}$ )	CACNA1G	17q21	T	Cav $\gamma$	$\gamma_1$	CACNG1	17q26
		CACNA1H	16p13.3	T		$\gamma_2$	CACNG2	22q13
		CACNA1I	22q13	T		$\gamma_3$	CACNG3	16p12
						$\gamma_4$	CACNG4	17q26
						$\gamma_5$	CACNG5	17q26
						$\gamma_6$	CACNG6	19q13.4
						$\gamma_7$	CACNG7	19q13.4
						$\gamma_8$	CACNG8	19q13.4

**Tabla 4. Proteínas que forman los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje humanos.** \* Subunidades que se expresan en el corazón. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

#### • Subunidad $\beta$

Las subunidades  $\beta$  son proteínas citosólicas que se ensamblan con las subunidades  $\alpha_1$  mediante un dominio de interacción  $\beta$  (DIB) que se une al dominio de interacción  $\alpha$  (DIA) de la subunidad  $\alpha_1$  (Figura 8) (De Waard y cols., 1994; Pragnell y cols. 1994). Estas subunidades regulan la expresión en la membrana de los canales de  $Ca^{2+}$  HVA (Bichet y cols., 2000). Además, modulan las propiedades biofísicas del canal (Jangsangthong y cols., 2010) e intervienen en la regulación por pH (Schuhmann y cols., 1997) o por receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Mikala y cols., 1998). Otro posible papel de las subunidades  $\beta$  es intervenir en el proceso de “facilitación” de la  $I_{Ca,L}$  (Cens y cols., 1996; Buraei y Yang, 2010). La facilitación produce un aumento de la densidad de corriente y una ralentización de la inactivación tras la fosforilación del canal por la proteína quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /Calmodulina (CaMKII) (Sculptoreanu y cols., 1993; Yang y cols., 2003).

- Subunidad  $\alpha_2/\delta$

El complejo  $\alpha_2/\delta$  está formado por la unión de la subunidad extracelular  $\alpha_2$  y la subunidad transmembrana  $\delta$  mediante un puente disulfuro (Figura 9). La función del complejo  $\alpha_2/\delta$  varía según las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  con las que interacciona, aunque se ha sugerido que el dominio  $\delta$  interviene en los cambios cinéticos mientras que el dominio  $\alpha_2$  es responsable del aumento de la expresión del canal en la membrana (Hofmann y cols., 1994; Mori y cols. 1996).

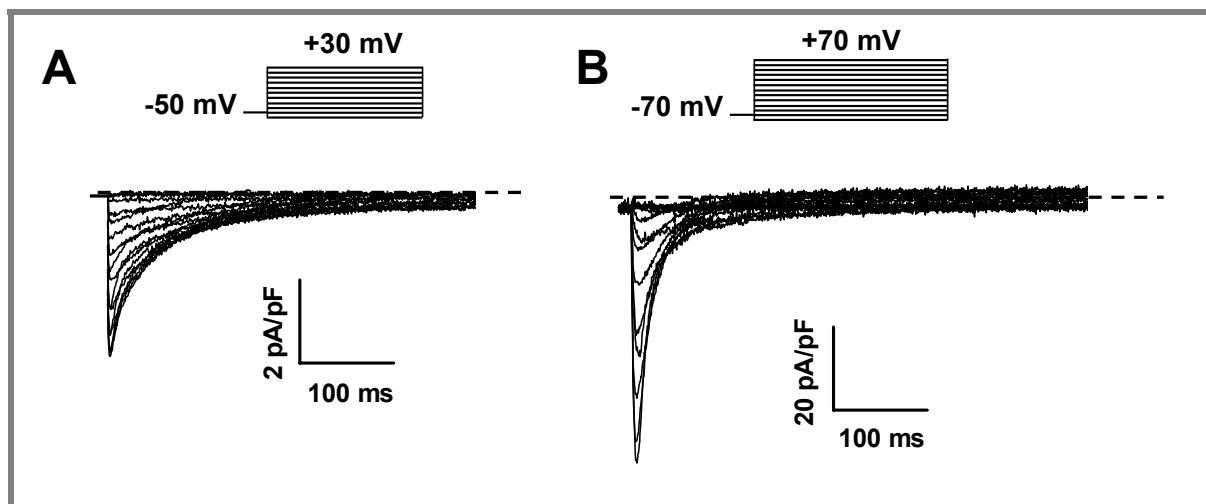
- Subunidad  $\gamma$

La subunidad  $\gamma$  es una proteína con cuatro dominios TM y extremos N- y C-terminales intracelulares de la que existen al menos 8 isoformas, aunque ninguna de ellas se expresa en tejido cardíaco (Kang y Campbell, 2003).

### 2.2.2. Características de la $I_{Ca,L}$

La  $I_{Ca,L}$  registrada en miocitos cardíacos presenta un potencial umbral de activación de alrededor de -30 mV y alcanza su máxima amplitud a potenciales entre 0 y +10 mV. La activación y la inactivación son relativamente lentas, alcanzándose el pico máximo al cabo de 1-5 ms (Figura 10).

La inactivación de la corriente es un proceso que depende del voltaje y de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Zhang y cols., 1994). En los canales de  $Ca^{2+}$ , los procesos de inactivación y de recuperación de la inactivación están regulados por cambios estructurales en diferentes partes de la subunidad  $\alpha_1$ , incluyendo el poro, los lazos intracelulares y el extremo C-terminal. Además, se ha comprobado que también participan interacciones con proteínas intracelulares y subunidades auxiliares como la subunidad  $\beta$ . La inactivación debida a altas  $[Ca^{2+}]_i$  representa un mecanismo de retroalimentación negativo de gran importancia (Brehm y Eckert, 1978) en el que están implicados un motivo de unión a calmodulina (CaM) (el “motivo IQ”), un motivo en “mano EF” y los péptidos A y C que se encuentran en el extremo C-terminal del canal (Figura 8) (Zuhlke y cols., 1999; Peterson y cols., 2000). Así, tras la despolarización y la entrada de  $Ca^{2+}$ , la  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta hasta el rango micromolar, lo que hace que el  $Ca^{2+}$  se una a la CaM asociada al canal y se promueva la inactivación. En la inactivación dependiente de voltaje, el lazo DI-DII actúa como partícula bloqueante del canal (Kim y cols., 2004a).



**Figura 10. Registros de  $I_{Ca,L}$ .** (A)  $I_{Ca,L}$  registrada en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Corriente de  $Ca^{2+}$  registrada en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. La corriente fue registrada en células CHO transfectadas de forma transitoria con las subunidades  $Cav\alpha1.2$ ,  $Cav\beta_2$  y  $Cav\alpha_2/\delta$ .

### 2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{Ca,L}$

Los miembros de la familia Cav1 codifican las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, siendo la Cav1.2 ( $\alpha_{1C}$ ) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005). Se han identificado tres variantes de la isoforma Cav1.2 (Cav1.2a-c), de las que la Cav1.2a es la isoforma cardíaca específica. Además, en el corazón estos canales presentan dos tipos de subunidades auxiliares, las subunidades  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$  (Tabla 4). El canal de  $Ca^{2+}$  tipo L es una importante diana farmacológica para el tratamiento de diversas patologías. Los fármacos que inhiben la  $I_{Ca,L}$  (denominados “antagonistas del  $Ca^{2+}$ ”) están indicados en el tratamiento de diversas patologías como angina de pecho, hipertensión arterial (HTA), vasculopatías periféricas, algunas taquiarritmias supraventriculares y como protectores renales y cardíacos. Los antagonistas del  $Ca^{2+}$  se dividen estructuralmente en 3 grupos: las DHP (como el nifedipino), las bencilalquilaminas (como el verapamilo) y las benzotiazepinas (como el diltiazem). Todos ellos tienen su sitio de unión en el poro del canal (Hering y cols., 1996; Hockerman y cols., 1995; Schuster y cols., 1996; He y cols., 1997; Hockerman y cols., 1997).

### 2.2.4. Canalopatías asociadas al canal de $Ca^{2+}$ tipo L

La canalopatía más importante que se ha identificado es la causada por la mutación Gly406Arg en el gen que codifica la subunidad Cav1.2 (CACNA1C), que se ha relacionado con la aparición de síndrome de Timothy (SQTL tipo 8) (Splawski y cols., 2004; Bidaud y

Lori, 2011). Esta mutación produce un aumento en la amplitud de la  $I_{Ca,L}$  como consecuencia de la separación de la unión entre las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  y se manifiesta con alteraciones multiorgánicas que afectan al miocardio (prolongación del intervalo QT y arritmias graves e incluso letales), inmunodeficiencia y autismo, debido a la amplia distribución de la subunidad Cav1.2 (Splawski y cols., 2004).

Se han descrito otras mutaciones en los genes que codifican la subunidad  $\alpha$  Cav1.2 (Antzelevitch y cols., 2007), y las subunidades auxiliares Cav $\beta$ 2b (Cordeiro y cols., 2009) y Cav $\alpha_2/\delta_1$  (Burashnikov y cols., 2010) que reducen la entrada de  $Ca^{2+}$  durante la fase de meseta del PA y que se han relacionado con la aparición de SB (tipos 3 y 4), SRT (tipos 2-4) y SQTC (tipos 4-6) (Cerrone y Priori, 2011).

### **2.3. Canales de $K^+$**

Los canales de  $K^+$  constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas de membrana. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células, donde juegan un importante papel, por ejemplo, en el mantenimiento del PR celular, el control de la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales o la regulación de la contracción del músculo liso esquelético y cardíaco (Tabla 5).

A nivel cardíaco, los canales de  $K^+$  juegan un papel fundamental en el PA, ya que permiten la salida de  $K^+$  de la célula, lo que conduce a la repolarización celular. Las cinéticas de activación e inactivación de cada canal determinan su participación en el control de la repolarización: los canales que se activan rápidamente intervienen en la repolarización durante las primeras fases del PA, mientras que los canales que generan corrientes rectificadoras tardías que se activan lentamente participan fundamentalmente en la repolarización durante la fase 3. Los canales de  $K^+$  presentan una distribución heterogénea en función del tejido (aurícula frente a ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio frente a epicardio). La heterogeneidad en los tipos y en la distribución de los canales de  $K^+$  determina la diferencia en la morfología de los PA de las distintas regiones del corazón (Figura 1). Además, la expresión y las propiedades de los canales de  $K^+$  también pueden verse modificadas por fármacos, hormonas y diferentes patologías.

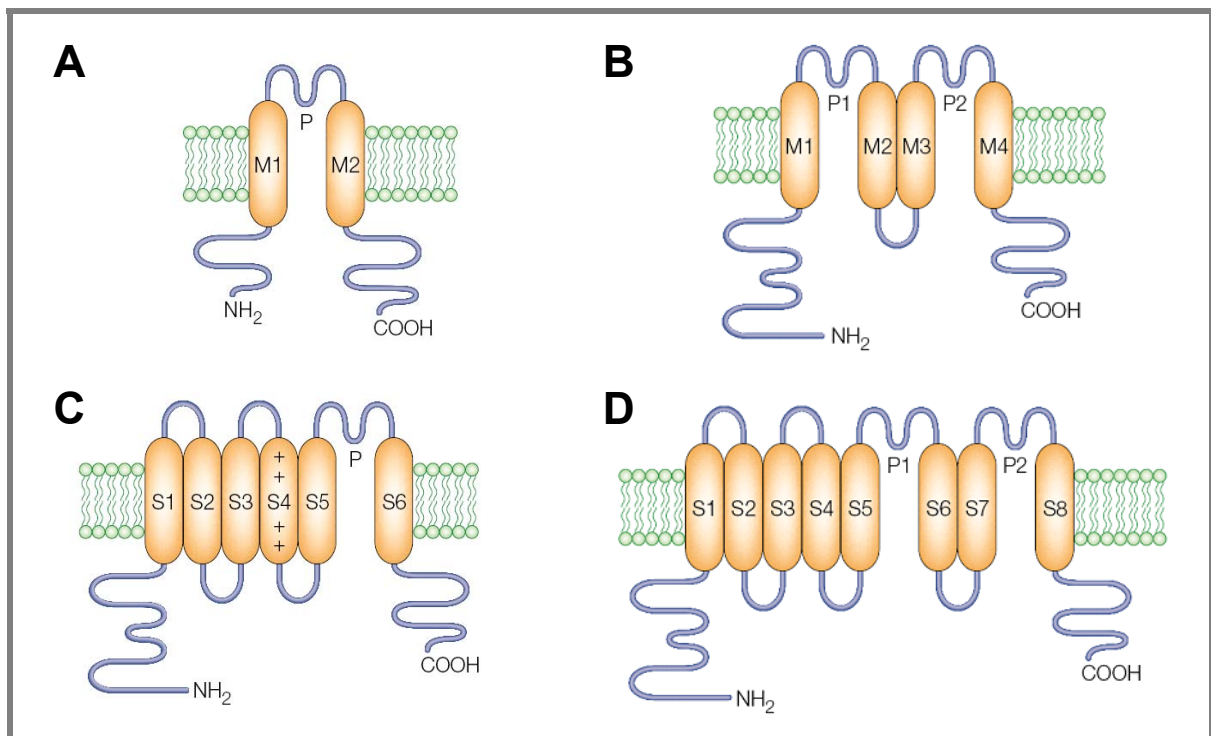
El estudio electrofisiológico del mutante *Shaker* de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), denominado así por el aleteo constante que se observaba en estas moscas al ser anestesiadas con éter, permitió la clonación y secuenciación del primer canal de  $K^+$  (Jan y cols., 1983). Desde entonces, el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido identificar más de 200 genes que codifican canales de  $K^+$  (Coetzee y cols., 1999; Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004b; Gutman y cols., 2005; Li y Dong, 2010).

Corriente	Subunidad $\alpha$			Subunidad $\beta$		
	Proteína	Gen	Locus	Proteína	Gen	Locus
$I_{K1}$	Kir2.1 (IRK1)	KCNJ2	17q23.1-24.2			
	Kir2.2 (IRK2)	KCNJ12	17p11.1			
	Kir2.3 (IRK3)	KCNJ4	22q13.10			
$I_{K,ACh}$	Kir3.1 (GIRK1)	KCNJ3	2q24.1			
	Kir3.4 (GIRK4)	KCNJ5	11q24			
$I_{K,ATP}$	Kir6.2 (BIR)	KCNJ11	11p15.1	SUR2A	ABCC9	12p12.1
$K_{2P}$	K <sub>2p</sub> 1.1 (TWIK-1)	KCNK1	1q42-43			
	K <sub>2p</sub> 2.1 (TREK-1)	KCNK2	1q41			
	K <sub>2p</sub> 3.1 (TASK-1)	KCNK3	2p24.1-23.3			
	K <sub>2p</sub> 5.1 (TASK-2)	KCNK5	6p21			
	K <sub>2p</sub> 6.1 (TWIK-2)	KCNK6	19q13-1			
	K <sub>2p</sub> 9.1 (TASK-3)	KCNK9	8q24-3			
	K <sub>2p</sub> 10.1 (TREK-1)	KCNK10	14q31			
	K <sub>2p</sub> 13.1 (THIK-1)	KCNK13	14q24.1-24.3			
	K <sub>2p</sub> 17.1 (TASK-4)	KCNK17	6p21.1-2			
$I_{to1}$	Kv4.3	KCND3	11p15.1	KChIP2	KCNIP2	10q25
				DPPX	DPP6	7q36.2-36.3
				MiRP1	KCNE2	21q22.12
				MiRP2	KCNE3	11q13-q14
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	Kv $\beta$ 1	KCNAB1	3q25
				Kv $\beta$ 2	KCNAB2	1p36.3
	Kv4.1	KCND1	Xp11.23	KChIP1	KCNIP1	5q35
	Kv4.2	KCND2	7q31	KChIP2	KCNIP2	10q25
	Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Kv $\beta$ 1	KCNAB1	3q25
				Kv $\beta$ 2	KCNAB2	1p36.3
$I_{Ks}$	Kv7.1 (KCNQ1)	KCNQ1	11p15.5	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2
$I_{Kr}$	Kv11.1 (hERG)	KCNH2	7q35-36	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2
				MiRP1	KCNE2	21q22.1

**Tabla 5. Subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales que generan las diferentes corrientes de  $K^+$  cardíacas humanas.** Entre paréntesis, nombre alternativo de algunas de las proteínas. [Adaptada de Tamargo y cols., 2004b]

Los canales de  $K^+$  se clasifican de acuerdo al número de segmentos TM y de poros que presentan (Figura 10):

- Canales formados por 2 segmentos TM y 1 poro (2TM/1P) (canales de  $K^+$  rectificadores internos o canales Kir).
- Canales formados por 4 segmentos TM y 2 poros (4TM/2P) (canales K2p).
- Canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P) (canales de  $K^+$  dependientes de voltaje o canales Kv). Incluye también a los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ , que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal (canales BKCa).
- Canales formados por 8 segmentos TM y 2 poros (8TM/2P), sólo encontrados en levaduras.



**Figura 11. Topología de la subunidad  $\alpha$  de los cuatro grandes grupos de canales de  $K^+$ .** (A) Canales 2TM/1P. (B) Canales 4TM/2P (C) Canales 6TM/1P (D) Canales 8TM/2P. [Adaptadas de Choe, 2002]

### 2.3.1. Canales 2TM/1P

Los canales 2TM/1P o canales Kir, desempeñan varias funciones importantes como el control de la señalización neuronal, la frecuencia cardíaca o la liberación de insulina. Desde un punto de vista evolutivo, los canales 2TM/1P son los más antiguos y su estructura recuerda a los S5 y S6 de los canales Kv. Sin embargo, los canales Kir carecen de una estructura semejante al aparato sensor de voltaje de los canales Kv (S1 a S4).

Tras el clonaje de los primeros canales Kir (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y b), se

han identificado muchas más proteínas pertenecientes a esta familia de canales. Actualmente, la familia de canales Kir se compone de 7 subfamilias (Kir1 a Kir7) (Tabla 6), con distintas propiedades, diferente distribución y más o menos bien definidas funciones fisiológicas para cada una de ellas (Kubo y cols., 2005). Estas subfamilias se pueden clasificar en cuatro grupos: los canales que participan en el mantenimiento del PR (Kir2), los canales acoplados a proteínas G (Kir3), los canales sensibles a ATP (Kir6) y los canales transportadores de  $K^+$  (Kir1, Kir4 y Kir7).

Familia	Corriente	Proteína	Gen	Cromosoma	Localización
<b>Kir1 (ROMK)</b>		Kir1.1-1.3	KCNJ1	17q25	Riñón, corazón, páncreas
<b>Kir2 (IRK)</b>	$I_{K1}$	Kir2.1	KCNJ2	17q23.1-24.2	Corazón, SNC, ME, ML, pulmón, placenta, riñón
		Kir2.2	KCNJ12	17p11.1	Corazón
		Kir2.3	KCNJ4	22q13.10	Corazón, SNC, ME
		Kir2.4	KCNJ14	19q13.1-13.3	Corazón, SNC, retina
<b>Kir3 (GIRK)</b>	$I_{K,ACh}$	Kir3.1	KCNJ3	2q24.1	Corazón, cerebelo
		Kir3.2	KCNJ6	21q22.13-22.2	Corazón, páncreas
		Kir3.3	KCNJ9	1q21-23	SNC
		Kir3.4	KCNJ5	11q24	Corazón, páncreas
<b>Kir4 (BIR10)</b>		Kir4.1	KCNJ10	1q22-q2	Glía
		Kir4.2	KCNJ15	21q22.2	Riñón, pulmón, SNC
<b>Kir5</b>		Kir5.1	KCNJ16	17q23.1-24.2	SNC, SNP
<b>Kir6</b>	$I_{K,ATP}$	Kir6.1	KCNJ8	12p11.23	Heterogénea
		Kir6.2	KCNJ11	11p15.1	Heterogénea
<b>Kir7</b>		Kir7.1	KCNJ13	2q37	SNC, riñón, tiroides

**Tabla 6. Familias de canales de  $K^+$  2TM/1P en mamíferos.** ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico.

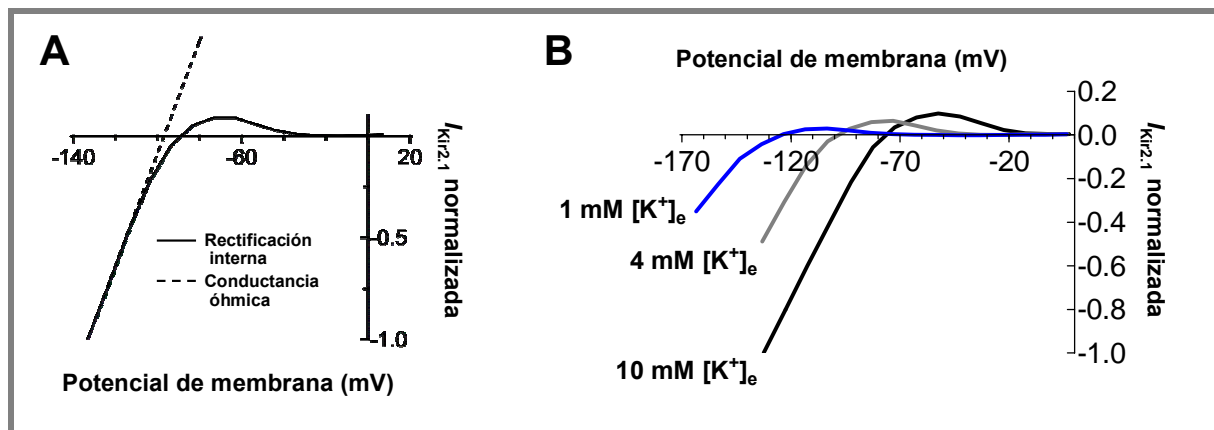
### 2.3.1.a. La rectificación interna en los canales Kir

Los canales iónicos se pueden considerar como resistencias eléctricas situadas en la membrana plasmática que permiten el paso de cargas en forma de iones entre dos compartimentos (los medios intra y extracelular) (Dhamoon y Jalife, 2005). Las resistencias, que son independientes del tiempo y del voltaje, tienen una relación corriente-voltaje (relación I-V) lineal que se describe mediante la ley de Ohm (conductancia óhmica):

$$\text{Voltaje} = \text{Intensidad} \cdot \text{Resistencia} \quad (7)$$



La conductancia ( $G$ ) es la inversa de la resistencia, y frecuentemente se usa para describir las propiedades biofísicas del canal. Al contrario de lo que predice la Ley de Ohm, la rectificación interna se puede describir como una relación I-V no lineal donde aparece una reducción muy marcada y dependiente de voltaje de la amplitud de la corriente conforme se produce la despolarización de la membrana. Como resultado los canales de  $K^+$  que presentan rectificación interna generan una corriente de entrada de gran amplitud a potenciales más negativos del  $E_K$ , mientras que a potenciales más positivos generan una corriente de salida de amplitud mucho menor (Figura 12).



**Figura 12. Características de la rectificación interna en la  $I_{K1}$ .** (A) Relación I-V de la corriente  $I_{Kir2.1}$ . Se muestra la corriente esperada si el comportamiento del canal siguiese la ley de Ohm (línea punteada). (B) Efectos de la  $[K^+]_e$  sobre la  $I_{Kir2.1}$ . [Adaptadas de Dhamoon y Jalife, 2005 (A) y Gómez y cols., 2009 (B)]

Todos los canales Kir presentan una relación I-V con rectificación interna, pero existen grandes diferencias en cuanto al grado de rectificación, regulación y distribución (Tabla 6). Las subfamilias Kir2 y Kir3 son las que presentan corrientes con una rectificación interna más marcada (los canales que se han denominado como “muy rectificadores”), similares a las originalmente descritas por Katz en músculo esquelético (Katz, 1949).

La rectificación interna que presentan los canales Kir se atribuye al bloqueo dependiente de voltaje del poro del canal por cationes endógenos (Matsuda y cols., 1987; Vandenberg, 1987), y en particular por poliaminas intracelulares como la espermina, la espermidina y la putrescina (Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994). El bloqueo por  $Mg^{2+}$  intracelular también participa en el proceso de rectificación interna.

Otra propiedad de estas corrientes es que presentan dependencia de la concentración extracelular de  $K^+$  ( $[K^+]_e$ ). En concreto, un aumento de la  $[K^+]_e$  produce un aumento de la probabilidad de apertura del canal y el desplazamiento hacia potenciales más positivos de la relación I-V (en paralelo al desplazamiento del  $E_K$ ).

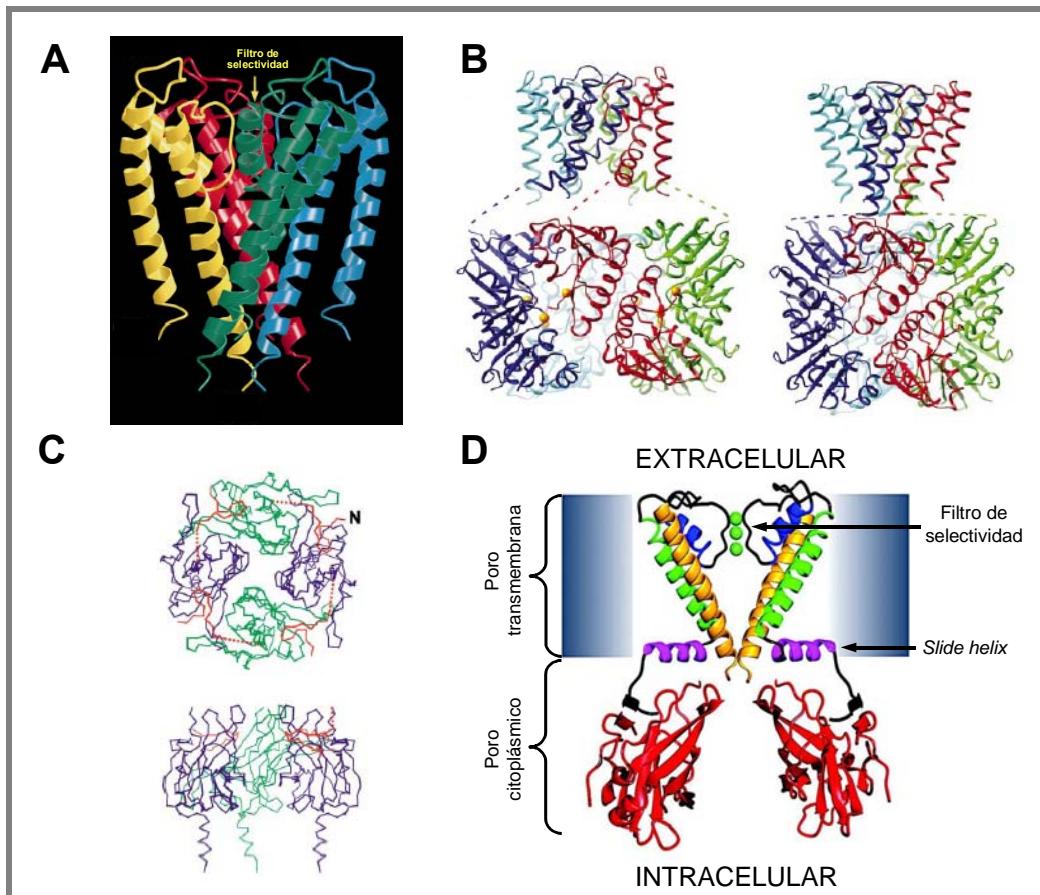
También se ha descrito que el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) es capaz de modular todos los canales Kir tanto en células nativas como en sistemas de expresión heterólogos (Logothetis y cols., 2007; Lopes y cols., 2007; Cheng y cols., 2011). Se ha demostrado que las interacciones entre el PIP<sub>2</sub> y el canal Kir2.1 producen un aumento de la probabilidad de apertura de los mismos, favoreciendo la estabilización del canal en el estado abierto y facilitando las transiciones desde el estado cerrado hacia el abierto (Xie y cols., 2008), mediante la interacción con residuos del canal situados en su mayoría en la parte superior del dominio citoplásmico (la más próxima a la cara interna de la membrana plasmática) y en la *slide helix* (Lopes y cols., 2002; Logothetis y cols., 2007). Por ello, se ha propuesto que el PIP<sub>2</sub> modula los canales Kir interaccionando con los extremos N- y C-terminales de los mismos, aproximando el dominio intracelular a la cara citoplásmica de la membrana y facilitando la apertura del canal (Figura 13) (Logothetis y cols., 2007). Recientemente, nuestro grupo ha descrito que la flecainida, un antiarrítmico de clase Ic, aumenta selectivamente la  $I_{K1}$  generada por homotetrámeros de Kir2.1 uniéndose a la Cys311, residuo inmediatamente anterior a la Arg312, que modula las interacciones entre el PIP<sub>2</sub> y el canal (Caballero y cols., 2010).

### 2.3.1.b. Estructura de los canales Kir

En 1998 se describió por primera vez la estructura cristalográfica mediante difracción con rayos X de un canal de K<sup>+</sup>, el canal bacteriano *KcsA* (Doyle y cols., 1998). Gracias a este estudio y a las cristalizaciones posteriores de otros canales 2TM/1P tanto bacterianos, *MthK* (Jiang y cols., 2002a y 2002b) y *KirBac* (Kuo y cols., 2003), como de mamíferos, Kir3.1 (Nishida y MacKinnon, 2002) y Kir2.2 (Tao y cols., 2009), se ha podido avanzar en el conocimiento de los aspectos fundamentales de la estructura y del funcionamiento de estos canales de K<sup>+</sup>.

Los canales Kir están formados por cuatro subunidades 2TM/1P que se disponen simétricamente alrededor de un poro central (Figura 13). Cada subunidad consta de dos hélices  $\alpha$  (M1 y M2) conectadas por una secuencia de 30 aminoácidos (lazo P) en la que se encuentra el filtro de selectividad del canal (Doyle y cols., 1998). Esta región está formada por una secuencia de aminoácidos (T-X-G-Y(F)-G) muy conservada en todos los canales de K<sup>+</sup> (*K<sup>+</sup> channel signature*). Cabe destacar que estos canales carecen del aparato sensor del voltaje que sí poseen los canales de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> sensibles a voltaje. El dominio N-terminal

y el voluminoso dominio C-terminal son citoplasmáticos. En el extremo amino terminal aparece una estructura de  $\alpha$ -hélice (*slide helix*) que se dispone paralela a la membrana plasmática y que controla el movimiento de apertura del canal (Doyle y cols., 1998; Kuo y cols., 2003; Hibino y cols., 2010). La longitud del dominio citoplasmático de los canales Kir es, al menos, la misma que la de la porción transmembrana (Figura 13), lo que hace que estos canales presenten un poro iónico con una longitud total (poro citoplasmático + poro transmembrana) que es aproximadamente el doble de la de otros canales de  $K^+$  ( $\approx 60$  Å) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005; Hibino y cols., 2010). Además, este dominio citoplasmático se encuentra formando un tetrámero relativamente polar y con una carga neta negativa que explicaría ciertas características de la rectificación interna de estos canales.



**Figura 13. Canales 2TM/1P.** (A) Estructura del canal *KcsA* en una visión lateral del tetrámero. (B) Estructura cristalizada del canal *MthK* en el estado abierto (a la izquierda) y modelo hipotético de su configuración cerrada (a la derecha). (C) Estructura del dominio intracelular del canal Kir3.1 en una visión superior (desde la membrana hacia el citoplasma) (panel superior) y en una visión lateral (panel inferior). (D) Modelo de la estructura de dos de las subunidades que forman los canales Kir2 basado en la estructura cristalográfica del canal bacteriano KirBac1.1. Se pueden distinguir la *slide helix* (en rosa), los segmentos M1 y M2 (en verde y amarillo, respectivamente), el lazo P (en azul) y el dominio citoplásmico (en rojo). [Adaptadas de Doyle y cols., 1998 (A), Jiang y cols., 2002a (B), Nishida y MacKinnon, 2002 (C) y Kuo y cols., 2003 (D)]

### 2.3.1.c. Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales Kir

Dentro de la familia de canales Kir, las subfamilias Kir2, Kir3 y Kir6 son las que se expresan en el tejido cardíaco: los canales Kir2 participan en la formación de los canales que generan la  $I_{K1}$  (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), las subunidades Kir3.1 y Kir3.4 (pertenecientes al grupo de canales acoplados a proteínas G) forman el canal que genera la  $I_{K,ACH}$ , responsable de los efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados tras la estimulación vagal (Yamada y cols., 1998; Stanfield y cols., 2002), y las subunidades Kir6 heteromerizan con el receptor de sulfonilureas (SUR) para formar los canales que generan la corriente sensible a ATP ( $I_{K,ATP}$ ), responsable del acortamiento de la DPA que aparece durante la isquemia cardíaca (Nichols y cols., 1996; Seino y Miki, 2003).

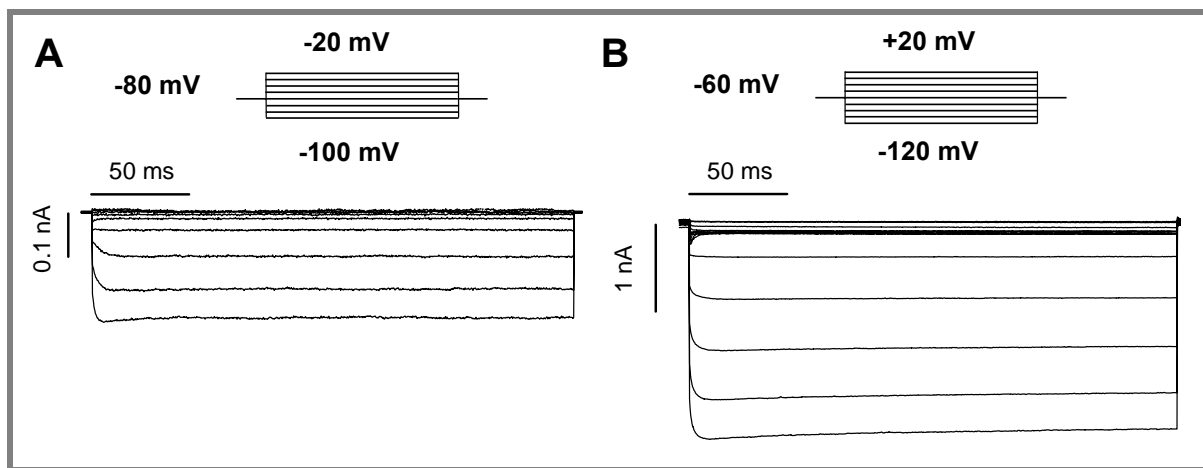
#### *I. La $I_{K1}$*

La corriente rectificadora interna  $I_{K1}$  es responsable de la fase final de la repolarización y del mantenimiento del PR auricular y ventricular (Nichols y cols., 1996; Lopatin y Nichols, 2001). Se han descrito mutaciones en los genes que codifican la expresión de las proteínas que forman los canales que generan la  $I_{K1}$  humana y que conducen a la pérdida o a la ganancia de función de los mismos. La pérdida de función disminuye la  $I_{K1}$  produciendo síndrome de Andersen, que a nivel electrofisiológico se caracteriza por la prolongación del QT (SQTL tipo VII). Por el contrario, la ganancia de función aumenta la  $I_{K1}$  provocando síndrome de QT corto tipo III (SQTC tipo III). Ambos síndromes, y en particular el SQTC, cursan con arritmias ventriculares graves y potencialmente mortales (Miake y cols., 2003; Zaritsky y cols., y 2001; McLerie y Lopatin, 2003).

#### *I.a. Características de la $I_{K1}$*

A potenciales más negativos que el PR, la  $I_{K1}$  presenta una conductancia mucho mayor que cualquier otra corriente, por lo que es la corriente encargada de fijar el PR cerca del  $E_K$ . Posteriormente, cuando se produce la despolarización, los canales se mantienen cerrados durante toda la fase de meseta y se abren a potenciales más negativos que -20 mV, por lo que la  $I_{K1}$  contribuye también de esta forma a la parte final de la fase 3 de la repolarización (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

Tal y como hemos visto, las distintas morfologías del PA registradas en el corazón se deben a la diferente expresión de las corrientes iónicas, incluida la  $I_{K1}$  (Schram y cols., 2002). La  $I_{K1}$  es prácticamente inexistente en células del nodo SA, lo que le permite mantener un PR relativamente despolarizado (-50 mV) y que éste no se mantenga estable durante la fase 4 (Schram y cols., 2002). Sin embargo, la  $I_{K1}$  está presente tanto en la aurícula como en el ventrículo aunque presenta diferencias significativas, ya que la corriente registrada en miocitos ventriculares es entre 6-10 veces mayor que la auricular, lo que permite mantener el PR más hiperpolarizado y una más rápida repolarización durante la fase 3 en el ventrículo (Lopatin y Nichols, 2001; Dhamoon y Jalife, 2005).



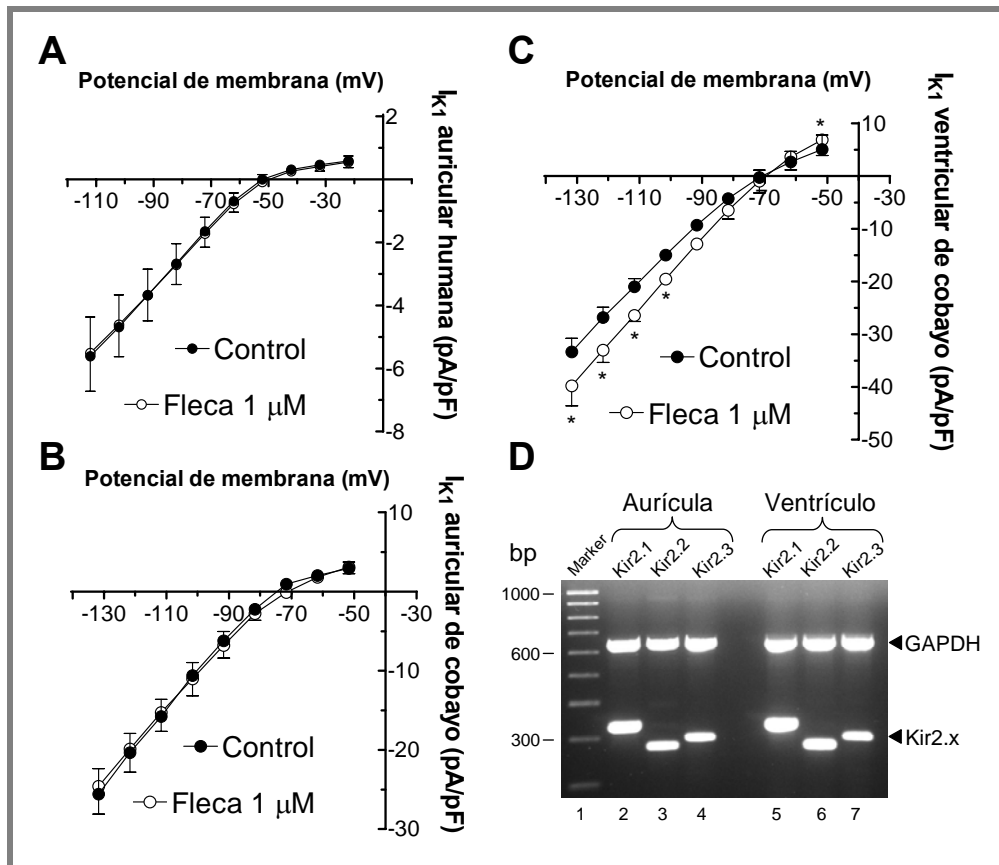
**Figura 14. Registros de  $I_{K1}$ .** (A) Familia de trazos de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Corriente de  $K^+$  rectificadora interna registrada en células CHO transfectadas de forma transitoria con la subunidad Kir2.1.

Al aplicar un pulso hiperpolarizante la  $I_{K1}$  alcanza un pico máximo de corriente con una “cinética de activación” muy rápida (1-2 ms) para, a continuación, disminuir ligeramente a durante la aplicación del pulso, hasta alcanzar un nivel estable de corriente (Figura 14). A potenciales más negativos que el  $E_K$ , se registra una corriente de entrada de  $K^+$  de gran amplitud, mientras que a potenciales más positivos que el  $E_K$ , se registra una corriente de salida de  $K^+$  de pequeña amplitud. Además, conforme el potencial aplicado se va haciendo más positivo, la amplitud de esta corriente de salida disminuye hasta hacerse cero debido al fenómeno de rectificación interna (Figura 14).

*I.b. Composición de los canales que generan la  $I_{K1}$* 

Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir2 (Kir2.1 a Kir2.4) en mamíferos, aunque la expresión de los canales Kir2.4 en el corazón es mínima (solamente se ha demostrado su presencia en las células nerviosas que inervan el miocardio) y parece localizarse preferentemente en sistema nervioso central (Liu y cols., 2001), lo que señala a los otros tres miembros de la familia como los canales responsables de la  $I_{K1}$  cardíaca. Se ha demostrado que la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  varía según la especie y el tipo celular estudiado y según la localización en la membrana de dichos canales (Zaritsky y cols., 2001; Kubo y cols., 2005, Gaborit y cols., 2007, Caballero y cols., 2010). Se ha tratado de averiguar dicha composición atendiendo a las diferencias que presentan cada uno de los miembros de la subfamilia Kir2 respecto a propiedades farmacológicas u a otras propiedades como la conductancia, la sensibilidad al  $Ba^{2+}$  y al pH o la “cinética de activación” (Liu y cols., 2001; Muñoz y cols., 2007). Recientemente nuestro grupo ha descrito que la flecainida es capaz de aumentar la corriente generada por canales Kir2.1 pero no las corrientes generadas por los canales Kir2.2 o Kir2.3, del mismo modo que no modifica la  $I_{K1}$  registrada en miocitos auriculares humanos o de cobayo. Sin embargo la flecainida es capaz de aumentar la corriente  $I_{K1}$ , tanto de entrada, como de salida de  $K^+$ , registrada en miocitos ventriculares de cobayo (Caballero y cols., 2010). Estos datos sugieren que la  $I_{K1}$  ventricular en cobayo está generada mayoritariamente por canales formados por cuatro subunidades de Kir2.1, mientras que la  $I_{K1}$  auricular está generada por heterotetrámeros de Kir2.x. A pesar de que tanto en aurícula como en ventrículo encontramos la presencia de ARNm de todos ellos (Caballero y cols., 2010), la expresión de Kir2.1 en tejido cardíaco de cobayo, es mayor en ventrículo que en aurícula, al igual que ocurría en humanos (Liu y cols., 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010, Caballero y cols., 2010) (Figura 15).

Mutaciones en el gen que codifica la subunidad Kir2.1 (KCNJ2) están implicadas en el síndrome de Andersen (SQTl tipo 7), en el SQTC tipo 3 y en la FA familiar tipo 4 (Cerrone y Priori, 2011).



**Figura 15. Composición de la  $I_{K1}$ .** (A-C) Relaciones I-V de la  $I_{K1}$  auricular humana (A), de miocitos auriculares de cobayo (B) y de miocitos ventriculares de cobayo (C) en situación control y en presencia de flecainida 1  $\mu$ M. (D) Niveles de expresión de canales Kir2.x de muestras auriculares y ventriculares de cobayo. La primera línea indica el marcador de pesos moleculares (1,000-100 pares de bases). Las líneas 2-4 y 5-7 muestran los niveles de expresión de Kir2.1 (325 pb), Kir2.2 (291 pb) y Kir2.3 (303 pb), en tejido auricular y ventricular, respectivamente. El gen GAPDH se usó como control interno [Adaptado de Caballero y cols., 2010]

## II. La $I_{K,ATP}$

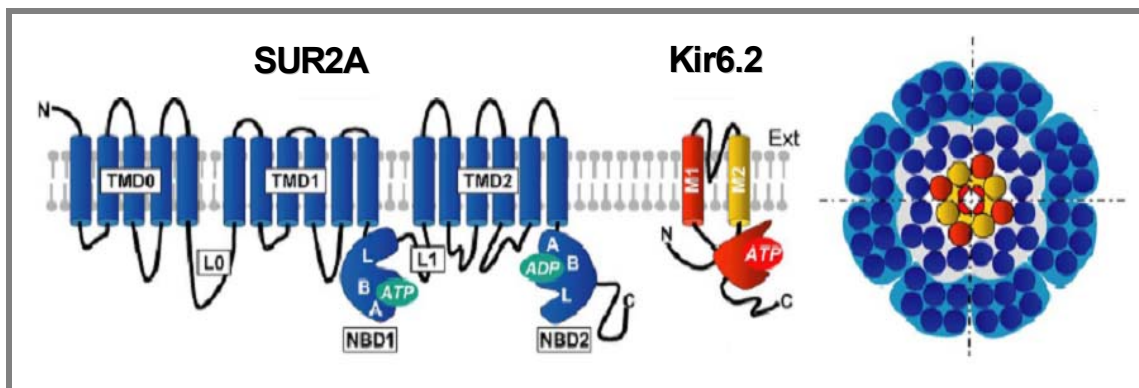
En el corazón, la corriente rectificadora  $I_{K,ATP}$  juega un importante papel durante la isquemia miocárdica y en el preconditionamiento isquémico (Seino y Miki, 2003; Nerbonne y Kass, 2005). El canal  $K_{ATP}$  es inhibido por al ATP intracelular y activado por el ADP-Mg, por lo que la actividad del canal es regulada por el cociente ADP/ATP (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Por otra parte, la  $I_{K,ATP}$  presenta una rectificación mucho menor que la de la  $I_{K1}$  o la  $I_{K,ACh}$  (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

### II.a. Composición de los canales que generan la $I_{K,ATP}$

El canal  $K_{ATP}$  cardíaco es el resultado de la asociación de 4 subunidades  $\alpha$  Kir6.2 con 4 subunidades auxiliares SUR2A (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Las

subunidades  $\alpha$  Kir6 están formadas por 2 segmentos TM (M1 y M2) y son las que confieren al canal la capacidad de ser regulado por el ATP (Tucker y cols., 1996). Las subunidades auxiliares SUR2A tienen 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos, NBD1 y NBD2 (*Nucleotide Binding Domain*), localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 y en la región C-terminal, respectivamente (Figura 16) (Conti y cols., 2001; Seino y Miki, 2003). Las subunidades SUR2A son las que confieren al canal la sensibilidad al ADP y a las sulfonilureas (Yokoshiki y cols., 1998; Moreau y cols., 2000; Seino y Miki, 2003). Sin embargo, hay estudios que demuestran la existencia de canales  $K_{ATP}$  cardíacos sin la presencia de la subunidad SUR (Pu y cols., 2001), por lo que la estructura molecular exacta del canal que genera la  $I_{K_{ATP}}$  en el miocardio sigue siendo controvertida.

La densidad de los canales que generan la  $I_{K_{ACh}}$  es muy alta en las células marcapaso de los nodos SA (donde regulan la frecuencia cardíaca) y AV (donde regulan la velocidad de conducción a través del nodo AV) (Mark y Herlitze, 2000). Además, juega un papel importante en el control de la DPA en el tejido auricular, donde la densidad de la  $I_{K_{ACh}}$  es 6 veces mayor que en el ventricular (Schram y cols., 2002; Tamargo y cols., 2004b).



**Figura 16. Estructura de los canales  $K_{ATP}$ .** Modelo estructural del canal  $K_{ATP}$  cardíaco formado por 4 subunidades Kir6.2 (en rojo y amarillo) y 4 subunidades SUR2A (en azul). Cada subunidad Kir6.2 está formada por 2 segmentos TM en  $\alpha$ -hélice y un largo dominio citoplásmico con el sitio de unión para el ATP. Cada subunidad SUR2A contiene 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 (L1) y en el extremo C-terminal. [Adaptada de Moreau y cols., 2005]

### III. La $I_{K_{ACh}}$

#### III.a. Características de la $I_{K_{ACh}}$

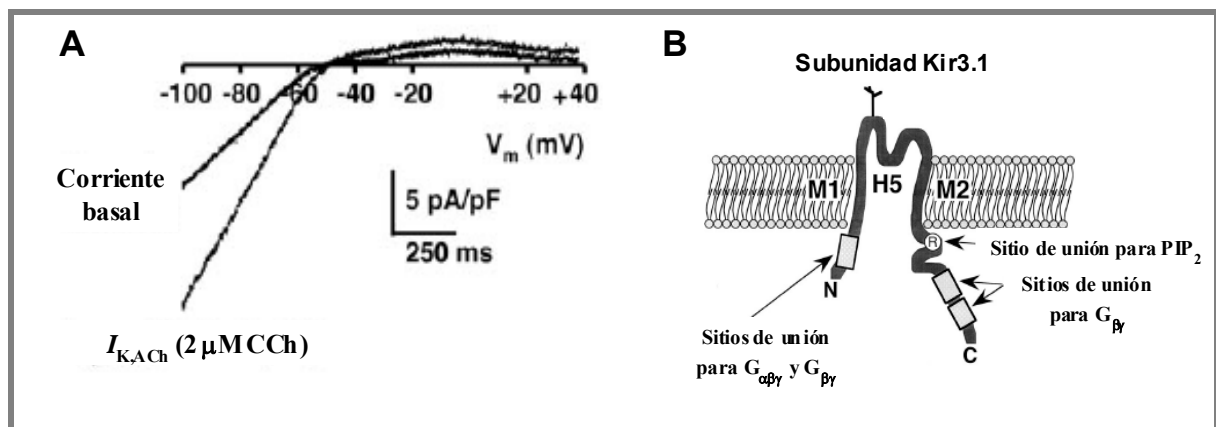
La ACh estimula los receptores  $M_2$  y produce la apertura de los canales  $K_{ACh}$  que generan una corriente que se caracteriza principalmente por una activación de cinética sigmoideal



dependiente de tiempo y de la dosis de agonista, por lo que se tardan cientos de ms en alcanzar la amplitud máxima de la corriente (Breitwieser y Szabo, 1988) (Figura 17A). Posteriormente, y aunque la ACh esté todavía presente, se produce la disminución gradual de la corriente hasta que se alcanza un nivel cercano al estado estable, denominado “*quasi-steady-state*” (Kurachi y cols., 1987). La apertura de los canales  $K_{ACh}$  inducida tras la estimulación del receptor muscarínico  $M_2$  está mediada por una proteína G heteromérica formada por una subunidad  $G_\alpha$  y un dímero  $G_{\beta\gamma}$  (Yamada y cols., 1998). La estimulación del receptor muscarínico promueve la disociación del dímero  $G_{\beta\gamma}$  de la subunidad  $G_\alpha$ . El dímero  $G_{\beta\gamma}$  es la molécula que interactúa con el canal promoviendo su activación (Yamada y cols., 1998). Se ha propuesto que la desensibilización a corto plazo del canal se debe a la disociación de las proteínas G del receptor tras la aplicación del agonista o a la fosforilación del receptor muscarínico  $M_2$  y la desfosforilación del canal (Yamada y cols., 1998).

La activación de la  $I_{K,ACh}$  hiperpolariza el  $E_m$  y reduce la frecuencia de disparo de las células del nodo SA, lo que explica su efecto cronotrópico negativo de la ACh. Además, reduce la velocidad de conducción a través del nodo AV, lo que explica por qué la estimulación vagal o la administración de adenosina intravenosa pueden parar las taquiarritmias por reentrada intranodal (Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004b).

La  $I_{K,ACh}$  es estimulada por el ATP intracelular, el  $PIP_2$  y por agonistas de los receptores  $\mu$ -opioides,  $\alpha_2$ -adrenérgicos, de adenosina A1 y de endotelina  $ET_A$  e inhibida por la distensión de la membrana (dependiente de la subunidad Kir3.4) y la acidificación del medio intracelular (Ji y cols., 1998; Shieh y cols., 2000; Tamargo y cols., 2004b).



**Figura 17. Características de la  $I_{K,ACh}$  y estructura de los canales  $K_{ACh}$ .** (A) Curva I-V en situación control y tras la aplicación de carbacol (CCh). (B) Esquema representativo de la estructura de la subunidad Kir3.1, formada por 2 segmentos transmembrana (M1 y M2) unidos por el lazo H5 y cuyos extremos N- y C-terminal son intracelulares. Se indican los sitios de unión de proteínas G y de  $PIP_2$ . [Adaptadas de Dobrev y cols., 2005 (A) y Yamada y cols., 1998 (B)]

### III.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACH}$

Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir3 (Kir3.1 a Kir3.4) en mamíferos y un quinto miembro (Kir3.5) en oocitos de *Xenopus laevis* (Hedin y cols., 1996).

En el corazón humano, los canales que generan la  $I_{K,ACH}$  están formados por el ensamblaje de subunidades Kir3.1 y Kir3.4, que forman una estructura tetrámerica siguiendo una estequiometría 2:2 (Dascal y cols., 1993; Krapivinsky y cols., 1995; Yamada y cols., 1998), mientras que la presencia de Kir3.2 y Kir3.3 es mínima o incluso nula (Wickman y cols., 1998). Se ha postulado que la subunidad Kir3.1 requiere de la presencia de la subunidad Kir3.4 para translocarse a la membrana celular y que se forme así el canal funcional (Kennedy y cols., 1996; Yamada y cols., 1998). Las regiones N- y C-terminales de la subunidad Kir3.1 son las responsables de la unión del dímero  $G_{\beta\gamma}$  al canal, aunque se ha propuesto que el extremo N-terminal de la subunidad Kir3.4 también participa en esta unión. La unión de la subunidad  $G_{\alpha}$  al canal parece estar mediada por el extremo N-terminal de Kir3.1 (Huang y cols., 1995; Tucker y cols., 1996) (Figura 17B).

#### 2.3.2. Canales 4TM/2P

Los canales 4TM/2P (también llamados  $K_{2P}$ ) se ensamblan como dímeros y generan corrientes “de fondo” (*background*) en una gran variedad de tejidos, aunque en el tejido muscular sus niveles de expresión son muy bajos o incluso nulos (Lesage y Lazdunski, 2000).

Desde que se clonó el primer canal de esta familia, el canal TASK-1 (Lesage y cols., 1996), se han clonado un gran número de estos canales que se clasifican en diferentes familias basándose en sus características farmacológicas y funcionales (Lesage y Lazdunski, 2000). A nivel cardíaco se han identificado 5 familias:

- Los canales TWIK (*Tandem of P domains in Weak Inward rectifier  $K^+$  channels*), que presentan una pequeña rectificación interna.
- Los canales TREK/TRAAK (*TWIK-RElated  $K^+$  channels* y *TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated  $K^+$  channels*), que son activados por ácidos grasos poliinsaturados y por la distensión de la membrana (*stretch*).
- Los canales TASK (*TWIK-related Acid-Sensitive  $K^+$  channels*), que son sensibles a la acidosis.

- Los canales TALK (*TWIK-related ALkalosis-activated K<sup>+</sup> channels*), que son sensibles a la alcalosis.
- Los canales THIK (*Tandem pore domain Halothane Inhibited K<sup>+</sup> channels*), que son inhibidos por halotano.

Posteriormente, se adoptó una nueva nomenclatura para nombrar estos canales (K<sub>2p</sub>x.y) y los genes que los codifican (KCNK1 a KCNK17) (Tabla 7).

Familia	Canal	Gen	Cromosoma	Localización
<b>TWIK</b>	K <sub>2p</sub> 1.1 (TWIK-1)	KCNK1	1q42	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas
	K <sub>2p</sub> 6.1 (TWIK-2)	KCNK6	19q11	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas, leucocitos
	K <sub>2p</sub> 7.1 (TWIK-3)	KCNK7	11q12	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, placenta, páncreas
	K <sub>2p</sub> 8.1 (TWIK-4)	KCNK8	11q12	
<b>TREK/ TRAAK</b>	K <sub>2p</sub> 2.1 (TREK-1)	KCNK2	1q41	SNC, corazón, placenta, pulmón, riñón
	K <sub>2p</sub> 10.1 (TREK-2)	KCNK10	14q32	SNC, páncreas, bazo, testículos
	K <sub>2p</sub> 4.1 (TRAAK)	KCNK4	11q12	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos, retina
<b>TASK</b>	K <sub>2p</sub> 3.1 (TASK-1)	KCNK3	2p24	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, testículos, bazo, retina, intestino, piel, útero
	K <sub>2p</sub> 5.1 (TASK-2)	KCNK5	6p21.1	SNC, ME, corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, útero
	K <sub>2p</sub> 9.1 (TASK-3)	KCNK9	8q24.3	SNC, corazón, hígado, pulmón, placenta, páncreas, testículos, leucocitos
	K <sub>2p</sub> 14.1 (TASK-4)	KCNK14		
	K <sub>2p</sub> 15.1 (TASK-5/KT3.3)	KCNK15	20q12	SNC, ME, placenta, testículos, páncreas
<b>TALK</b>	K <sub>2p</sub> 16.1 (TALK-1)	KCNK16	6p21	Páncreas
	K <sub>2p</sub> 17.1 (TALK-2)	KCNK17	6p21	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, páncreas, testículos, ovario, leucocitos
<b>THIK</b>	K <sub>2p</sub> 13.1 (THIK-1)	KCNK13	14q32	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos
	K <sub>2p</sub> 12.1 (THIK-2)	KCNK12	2p21	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos

**Tabla 7. Familias de canales de K<sup>+</sup> 4TM/2P.** ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

Los canales  $K_{2P}$  poseen una región central muy conservada (segmentos TM1 a TM4) y una gran diversidad en los extremos C- y N-terminales intracelulares (Figura 11B). En estos canales se conserva la secuencia G(Y/F)G en el primer poro, aunque en el segundo poro es reemplazada por la secuencia G(F/L)G. El hecho de que los canales  $K_{2P}$  estén abiertos de forma casi continua sugiere su posible implicación en la regulación del  $E_m$  y de la excitabilidad celular (Lesage y Lazdunski, 2000; Patel y Honoré, 2001; O'Connell y cols., 2002).

### 2.3.3. Canales 6TM/1P

Los canales 6TM/1P agrupan a los canales de  $K^+$  activados por voltaje (canales Kv) y a los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (canales  $BK_{Ca}$ ).

Tras el clonaje del canal *Shaker* (Jan y cols., 1983) se identificaron otras tres subfamilias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales Kv a las que se denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*. En mamíferos, estas cuatro familias se corresponden con las familias Kv1 (*Shaker*), Kv2 (*Shab*), Kv3 (*Shaw*) y Kv4 (*Shal*). Hasta la fecha, se han descrito doce familias de subunidades  $\alpha$  Kv (Kv1 a Kv12), con una homología aminoacídica de  $\approx 70\%$  dentro de una misma familia y de  $\approx 40\%$  entre diferentes familias (Tabla 8) (Gutman y cols., 2005). Además, la diversidad funcional de los canales Kv se ve aumentada por factores como: a) la formación de heterotetrámeros (Christie y cols., 1990; Ruppersberg y cols., 1990; Covarrubias y cols., 1991; MacKinnon, 1991); b) la presencia de miembros de las familias Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9, que no forman canales funcionales por sí solos sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades Kv2 formando heterotetrámeros (Gutman y cols., 2005); c) la presencia de proteínas auxiliares, que modifican la función y/o la expresión en la membrana de los canales Kv (Gutman y cols., 2005); d) modificaciones postranscripcionales (*splicing* alternativo), que dan lugar a diferentes isoformas de los canales a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997); y e) modificaciones postraduccionales, que regulan la función de muchos canales Kv mediante fosforilación, ubiquitinización, palmitoilización, nitrosilación, etc.

Familia	IUPHAR	Gen	Cromosoma	Localización
<b>Kv1 (<i>Shaker</i>)</b>	Kv1.1	KCNA1	12p13.3	Cerebro, corazón, retina, músculo esquelético, islotes pancreáticos
	Kv1.2	KCNA2	1p13	Cerebro, corazón, retina, músculo liso, islotes pancreáticos
	Kv1.3	KCNA3	1p13.3	Cerebro, pulmones, timo, hígado, nódulos linfáticos, testículos, linfocitos, fibroblastos, osteoclastos, plaquetas, islotes pancreáticos
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	Cerebro, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos
	Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Corazón, músculo liso, pituitaria, colon, riñón, estomago, aorta, arterias pulmonares, hipocampo
	Kv1.6	KCNA6	12p13.3	Cerebro, corazón, pulmones, testículos, músculo liso, arterias pulmonares, ovarios, astrocitos, oligodendrocitos
	Kv1.7	KCNA7	19q13.3	Corazón, músculo liso, placenta, arterias pulmonares
	Kv1.8	KCNA10	1p13.1	Riñón, cerebro, corazón, músculo esquelético, glándula adrenal
<b>Kv2 (<i>Shab</i>)</b>	Kv2.1	KCNB1	20q13.2	Cerebro, corazón, músculo esquelético, arterias pulmonares, pulmones, retina, cóclea
	Kv2.2	KCNB2	8q13.2	Cerebro, corazón, lengua, neuronas simpáticas, músculo liso
<b>Kv3 (<i>Shaw</i>)</b>	Kv3.1	KCNC1	11p15	Cerebro, pulmones, testículos, músculo esquelético
	Kv3.2	KCNC2	12q14.1	Cerebro, islotes pancreáticos, arterias mesentéricas
	Kv3.3	KCNC3	19q13.3-4	Cerebro, neuronas del SNC, arterias mesentéricas, córnea
	Kv3.4	KCNC4	1p21	Paratiroides, próstata, cerebro, células acinares pancreáticas
<b>Kv4 (<i>Shal</i>)</b>	Kv4.1	KCND1	Xp11.23	Cerebro, colon, corazón, pulmones, estómago, testículos, hígado, riñón, glándulas tiroideas, páncreas, arterias pulmonares
	Kv4.2	KCND2	7q31	Cerebro, corazón, cóclea
	Kv4.3	KCND3	1p13.3	Corazón, cerebro, músculo liso
<b>Kv5</b>	Kv5.1	KCNF1	2p25	Cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, páncreas
<b>Kv6</b>	Kv6.1	KCNG1	20q13	Cerebro, músculo esquelético, útero, ovarios, riñón, páncreas, piel, hueso, placenta, próstata, testículos
	Kv6.2	KCNG2	18q22-23	Corazón, cerebro
	Kv6.3	KCNG3	2p21	Cerebro, testículos, intestino, glándula adrenal, timo, pituitaria
	Kv6.4	KCNG4	16q24.1	Corazón, hígado, intestino, colon
<b>Kv7 (<i>KvLQT</i>)</b>	Kv7.1	KCNQ1	11p15.5	Corazón, riñón, recto, cóclea, páncreas, pulmones, placenta
	Kv7.2	KCNQ2	20q13.3	Cerebro, pulmones, testículos, corazón, ojo, placenta, intestino
	Kv7.3	KCNQ3	8q24	Cerebro, testículos, retina, colon
	Kv7.4	KCNQ4	1p34	Cóclea, placenta
	Kv7.5	KCNQ5	6q14	Cerebro, músculo esquelético

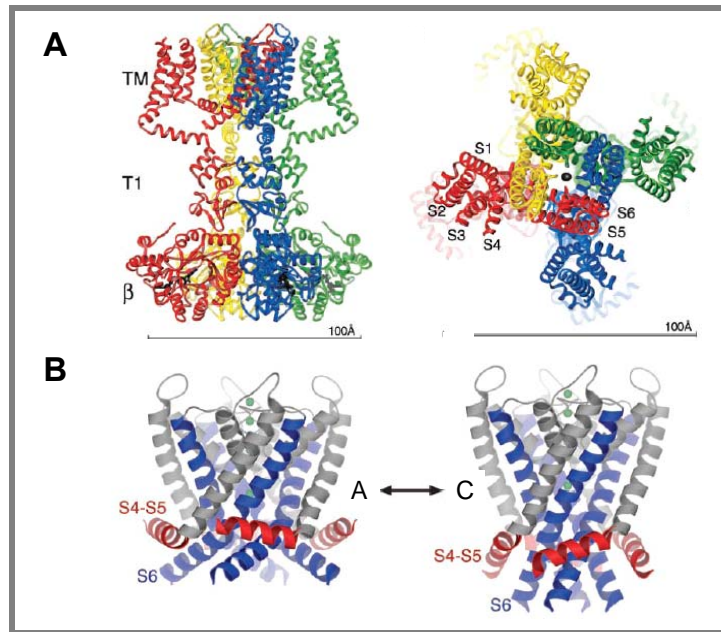
**Tabla 8. Familias de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje.** [Adaptada de Gutman y cols., 2005]

<b>Kv8</b>	Kv8.1	KCNV1	8q22.3-24.1	Cerebro, riñón
	Kv8.2	KCNV2	9p24.2	Pulmones, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, colon, ovarios
<b>Kv9</b>	Kv9.1	KCNS1	20q12	Cerebro, melanocitos
	Kv9.2	KCNS2	8q22	Cerebro, retina
	Kv9.3	KCNS3	2p24	Cerebro, colon, corazón, estómago, riñón, pulmones, testículos, piel, útero
<b>Kv10 (eag)</b>	Kv10.1	KCNH1	1q32-41	Cerebro, células tumorales
	Kv10.2	KCNH5	14q23.1	Cerebro
<b>Kv11 (erg)</b>	Kv11.1	KCNH2	7q35-36	Corazón, cerebro, células sanguíneas y tumorales, riñón, pulmón, hígado, ovarios, páncreas, testículos, próstata, intestino, útero
	Kv11.2	KCNH6	17q23.3	Cerebro, útero
	Kv11.3	KCNH7	2q24.2	Cerebro
<b>Kv12 (elk)</b>	Kv12.1	KCNH8	3p24.3	Cerebro, ganglios simpáticos, pulmones, útero, testículos, colon
	Kv12.2	KCNH3	12q13	Cerebro, pulmones
	Kv12.3	KCNH4	17q21.2	Cerebro, cerebelo, esófago, pulmones, glándula pituitaria

**Tabla 8 (Continuación). Familias de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje.** [Adaptada de Gutman y cols., 2005]

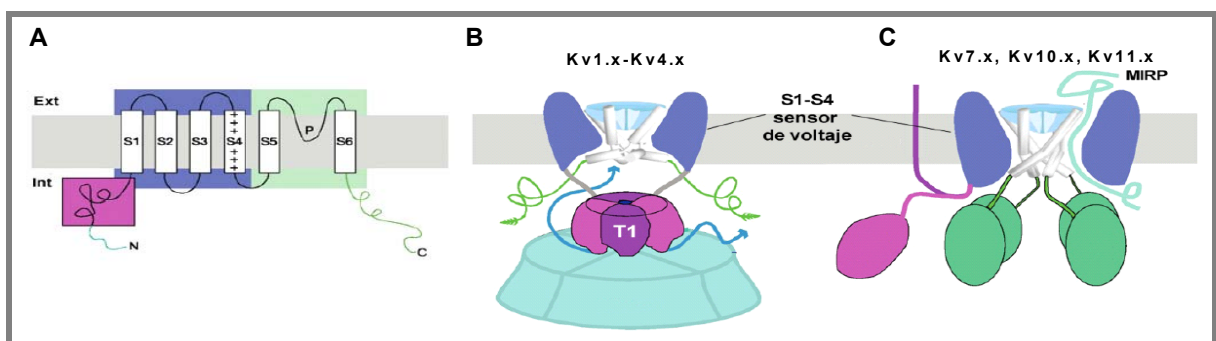
### 2.3.3.a. Estructura de los canales Kv

La primera estructura cristalográfica de un canal Kv de mamífero se resolvió en 2005. Era el canal formado por la subunidad  $\alpha$  Kv1.2 y la subunidad auxiliar Kv $\beta$ 2 de cerebro de rata (Long y cols., 2005a y b), que venía a confirmar los modelos que se habían propuesto anteriormente para los canales Kv tras la resolución de otros canales de K<sup>+</sup> no dependientes de voltaje (Doyle y cols., 1998; Zhou y cols., 2001) y de canales Kv bacterianos (Sokolova y cols., 2001; Jiang y cols., 2003a y b). La estructura resuelta se correspondía con la de un canal tetramérico en estado abierto cuyas dimensiones eran de 135x95x95 Å, con un poro de  $\approx$ 12 Å de diámetro (Figura 18).



**Figura 18. Estructura del complejo formado por la subunidad  $\alpha$  Kv1.2 y la subunidad auxiliar  $\beta_2$ .** (A) Vistas lateral (a la izquierda) y desde el lado extracelular (a la derecha) del complejo Kv1.2/Kv $\beta_2$ . (B) Modelo propuesto del canal Kv1.2, donde se observa la diferente posición del lazo S4-S5 en los estados abierto (a la izquierda) y cerrado (a la derecha). [Adaptadas de Long y cols., 2005a (A) y 2005b (B)]

Existen dos patrones fundamentales de organización estructural en la familia de canales Kv: los canales Kv1 a Kv4 presentan una estructura denominada T1 o “dominio NAB” (*N-terminal A and B box*) en el extremo N-terminal que se ha demostrado fundamental para el reconocimiento entre subunidades  $\alpha$  y responsable de la interacción con subunidades  $\beta$  y otras proteínas (Figura 19B), mientras que los canales Kv7, Kv10 y Kv11 no presentan ese dominio T1 (Figura 19C) (Shen y Pfaffinger, 1995; Xu y cols., 1995; Kreusch y cols., 1998; Yellen, 2002).



**Figura 19. Estructura de la subunidad  $\alpha$  de los canales Kv.** (A) Esquema de la estructura de la subunidad  $\alpha$  de los canales Kv, donde se observan los 6 segmentos TM y los segmentos N- y C-terminales intracelulares. El recuadro rosa indica la posición del dominio T1. (B y C) Disposición estructural de los dominios intracelulares de los canales Kv1 a Kv4 (B) y de los canales Kv7, Kv10 y Kv11 (C). [Adaptadas de Yellen, 2002]

## I. La subunidad $\alpha$

En los canales Kv, cada subunidad  $\alpha$  consta de 6 segmentos TM (S1 a S6) con estructura de hélice  $\alpha$  y conectados entre sí por secuencias hidrofílicas no conservadas (Figuras 11C y 19A). Los S1 a S4 constituyen el sensor de voltaje y la secuencia que conecta el S5 con el S6 se denomina región P y forma parte del poro iónico (Liman y cols., 1991; MacKinnon, 1991; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991).

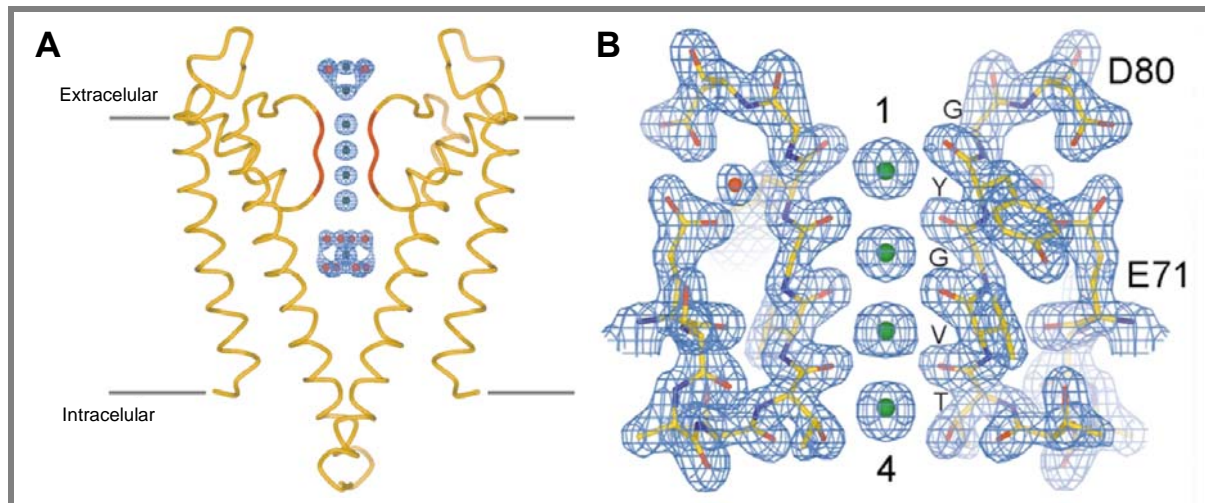
### • Poro iónico y filtro de selectividad

Las cuatro subunidades  $\alpha$  que forman el canal se disponen de tal forma que la boca externa del poro está formada por los lazos P de cada subunidad, mientras el segmento S6 y la región peptídica que une los segmentos S4 y S5 forman la boca interna del poro.

El poro iónico de los canales Kv está formado por una región de 20 aminoácidos del lazo P (Doyle y cols., 1998; Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Jiang y cols., 2002a). La región que une los segmentos S5 y S6 es el sitio de unión de muchas toxinas y el segmento de unión de S4-S5 forma parte del receptor para la partícula de inactivación (Isacoff y cols., 1991). Gracias a estudios de mutagénesis dirigida en canales, se ha podido demostrar que en el poro iónico se encuentran los lugares de unión para el tetraetilamonio (TEA) (Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993), fármacos antiarrítmicos como la quinidina (Yeola y cols., 1996), o anestésicos locales como la bupivacaína (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997) y la benzocaína (Caballero y cols., 2002).

El radio de un átomo de  $K^+$  es de 1.33 Å, mientras que el de un átomo de  $Na^+$  es de 0.95 Å. Pese a esta pequeña diferencia en el radio atómico, los canales de  $K^+$  son capaces de discriminar entre ambos iones con una selectividad superior a 1000 veces para el  $K^+$ , con una velocidad de conducción  $\approx 10^8$  iones/s. El filtro de selectividad del canal se encuentra en una región del lazo P formada por los aminoácidos (T/S)xxTxGYG, denominada “secuencia de selectividad del  $K^+$ ” y que está altamente conservada en todos los canales de  $K^+$  (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y cols., 1994). A excepción de los aminoácidos que forman el filtro de selectividad, los aminoácidos que constituyen las paredes del canal son hidrófobos, minimizándose así la interacción electrostática del  $K^+$  con el canal y creándose una ruta de baja resistencia desde el citoplasma hasta el filtro de selectividad que permite que el ion  $K^+$  hidratado pase fácilmente desde la solución intracelular hasta la cavidad central, donde alcanza una elevada concentración ( $\approx 2$  M) (Zhou y cols., 2001).





**Figura 20. Representación esquemática del filtro de selectividad de los canales de  $K^+$ .** (A) Representación esquemática de dos de las subunidades que forman el canal *KcsA* en una vista lateral, con la región que forma el filtro de selectividad señalada en rojo. Los sitios de unión de los iones  $K^+$  se representan como esferas verdes y las moléculas de agua como esferas rojas. (B) Detalle de la secuencia del filtro de selectividad del canal *KcsA*, donde se representan como esferas verdes los cuatro posibles ocupados por los iones  $K^+$ . [Adaptadas de Zhou y MacKinnon, 2003]

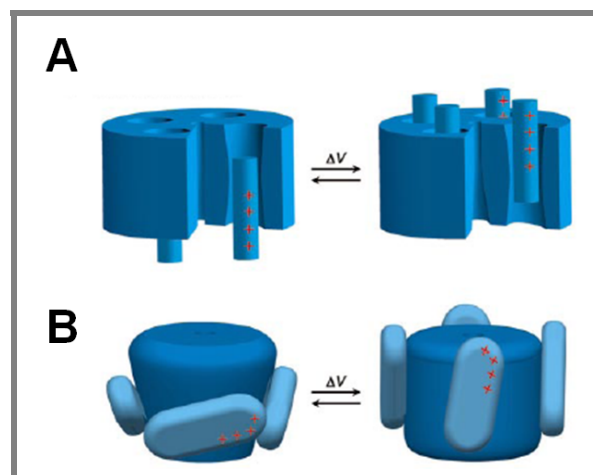
Una vez allí, el ion  $K^+$  ha de atravesar el estrecho paso que forma el filtro de selectividad y para ello ha de perder sus capas de hidratación. La entrada de un ion  $K^+$  en el filtro de selectividad crea un dipolo, de manera que un ion  $K^+$  dispone de cuatro sitios de unión a lo largo del filtro de selectividad, formados por los átomos de oxígeno de los carbonilos de los residuos TxGYG. Para compensar el coste energético que supone la deshidratación del ion al atravesar el filtro, los átomos de oxígeno hacen las veces de moléculas de agua de manera que durante su paso a través del filtro de selectividad los iones  $K^+$  se encuentran rodeados de ocho átomos de oxígeno, en una disposición similar a la que adoptan las moléculas de agua que rodean a los iones de  $K^+$  en el medio acuoso (Figura 20) (Roux y MacKinnon, 1999; MacKinnon, 2003).

El filtro de selectividad presenta una longitud de 12 Å, de manera que a lo largo del filtro normalmente se encuentran 2 iones  $K^+$  ( $\approx 2.7$  Å), separados por una molécula de agua, a una distancia de 3.5 Å (Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y MacKinnon, 2003). La presencia de un único ion  $K^+$  permitiría una fuerte interacción de éste con los aminoácidos del filtro, pero la entrada de un segundo ion produce una repulsión electrostática mutua, que compensa la atracción del filtro de selectividad y produce la salida del ion  $K^+$  hacia el espacio extracelular (Doyle y cols., 1998).

- Sensor de voltaje

La principal característica de los canales Kv consiste en que son capaces de detectar los cambios de voltaje producidos en la membrana y acoplar esta señal a su funcionamiento (Armstrong, 1974; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000 y 2002). La dependencia de voltaje de los canales de  $K^+$  se debe a la presencia en su estructura de un sensor de voltaje que está formado por los cuatro primeros segmentos del canal (S1-S4). El segmento S4 contiene cuatro o más residuos Arg y Lys, cada uno de los cuales separado por dos residuos hidrofóbicos, que se recolocan en la membrana cuando el  $E_m$  varía. Así, la apertura y cierre del canal generan un movimiento del sensor de voltaje de  $\approx 12$ -13 cargas elementales a través del campo eléctrico transmembrana (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995), resultando en una corriente de *gating* que puede ser medida experimentalmente (Armstrong y Bezanilla, 1973). Mutaciones en las que se neutralizan los aminoácidos cargados del S4 desplazan el valor del punto medio de la curva de activación del canal, lo que indica que el S4 juega un importante papel en el cambio conformacional que conlleva su apertura (Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991).

Dos son los principales modelos de movimiento del sensor propuestos: un modelo “de rotación”, con la exposición de determinados residuos del S4 en ranuras acuosas en las que el campo eléctrico está muy confinado (Figura 21A), y un modelo “de inclinación” o “modelo de remo”, que implica grandes desplazamientos del sensor a través del campo transmembrana (Figura 21B) (Jiang y cols., 2003b; Tombola y cols., 2005).



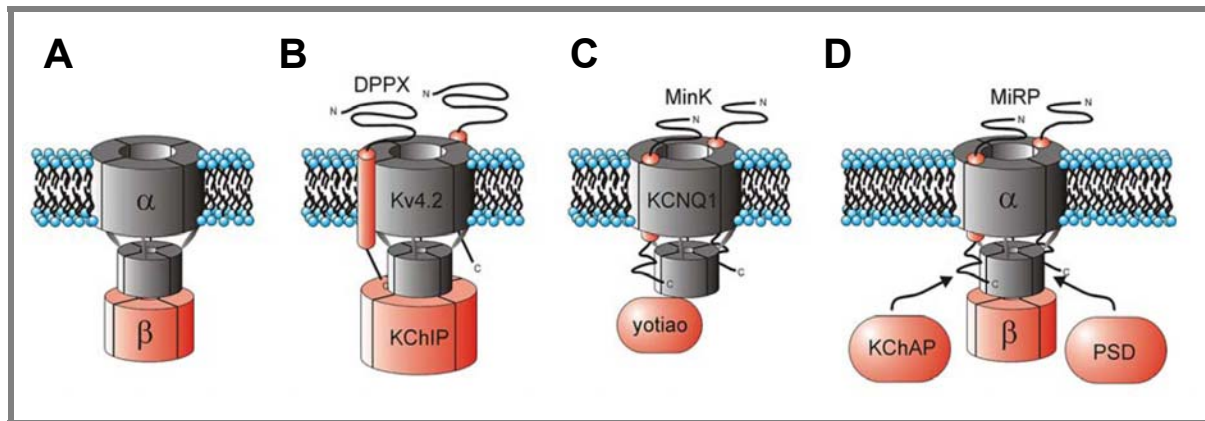
**Figura 21. Modelos de movimiento del sensor de voltaje.** (A) Modelo convencional en el que el movimiento de cargas se realiza a través del núcleo proteico del canal mediante un movimiento de traslación y/o rotación del S4. (B) Modelo en el que el sensor de voltaje se encuentra sumergido en los lípidos de la membrana, produciendo el desplazamiento de cargas a través del campo eléctrico. [Adaptadas de Jiang y cols., 2003b]

## II. Subunidades auxiliares

El ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  es suficiente para formar un canal funcional que genere una corriente iónica. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares aumenta la diversidad funcional de los canales Kv (Figura 22 y Tabla 9) y regula funciones como el *gating*, la expresión y/o el transporte a la membrana celular de los canales. Además, estas subunidades pueden servir como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos/endógenos.

Familia	Subunidad	Gen	Cromosoma
<b>Kv<math>\beta</math></b>	Kv $\beta$ 1*	KCNAB1	3q25
	Kv $\beta$ 2*	KCNAB2	1p36.3
	Kv $\beta$ 3	KCNAB3	17p13
<b>minK y péptidos relacionados (KCNE)</b>	minK*	KCNE1	21q22
	MiRP1*	KCNE2	21q22
	MiRP2*	KCNE3	11q13
	MiRP3	KCNE4	2q36.3
	MiRP4*	KCNE5	Xq22
<b>KChAP</b>	KChAP*	PIAS3	1q12
<b>KChIP</b>	KChIP1	KCNIP1	5q35
	KChIP2*	KCNIP2	10q25
	KChIP3	KCNIP3	2q11.2-11.3
	KChIP4.2	CSEN	2q11.1
	KChIP4.3	KCNIP4	4p15.3
<b>DPP</b>	DPP6*	DPP6	7q36.2-36.3
	DPP10*	DPP10	2q14.1

**Tabla 9. Principales subunidades auxiliares de los canales Kv.** \*Subunidades que se expresan en el miocardio. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]



**Figura 22. Dibujo esquemático de diversas subunidades auxiliares de canales iónicos.** Las subunidades  $\alpha$  aparecen en gris y las subunidades  $\beta$  en rojo. (A) Ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  Kv con 4 subunidades Kv $\beta$  citosólicas a través del extremo N-terminal. (B) Interacción del canal Kv4.2 con un complejo de 4 subunidades citoplásmicas KChIP. Se observa también la asociación de la subunidad DPPX con la subunidad  $\alpha$ . (C) Asociación de 4 subunidades Kv7.1 con 2 subunidades minK, así como la formación del complejo macromolecular con la proteína adaptadora yotiao. (D) Complejo molecular formado por una subunidad  $\alpha$  Kv, las subunidades auxiliares Kv $\beta$ , MiRP y KChAP y una proteína de densidad pos-sináptica (PSD). [Adaptadas de McCrossan y Abbott, 2004]

- Subunidades Kv $\beta$

La familia de las subunidades Kv $\beta$  está compuesta por tres proteínas homólogas (Kv $\beta$ 1 a Kv $\beta$ 3), así como varias isoformas de alguna de ellas (Wang y cols., 1996; Martens y cols., 1999). Estas proteínas poseen una simetría 4x muy similar a la de las enzimas óxido reductasa, por lo que se ha sugerido que podrían actuar como sensores redox del canal (Bähring y cols., 2001). Las subunidades Kv $\beta$  son proteínas citosólicas que se ensamblan a la subunidad  $\alpha$  por el extremo N-terminal y su principal efecto es inducir una rápida inactivación de la corriente (especialmente las Kv $\beta$ 1), aunque también se ha descrito una función tipo chaperona que podría promover o estabilizar la expresión de los canales en la membrana (Figuras 22A y D) (Nakahira y cols., 1996; Martens y cols., 1999; Wissmann y cols., 1999). Aunque las proteínas Kv $\beta$  se identificaron inicialmente como subunidades reguladoras de los canales Kv1, actualmente se piensa que participan también en la regulación de canales Kv2 y Kv4 (Yang y cols., 2001; Aimond y cols., 2005).

- Subunidad minK y péptidos relacionados

Hasta la fecha se han descrito 5 proteínas codificadas por genes de la familia KCNE (KCNE1 a KCNE5). Todas ellas presentan un único segmento TM, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

La proteína minK (*minimal K<sup>+</sup> channel subunit*) fue la primera en ser identificada (Takumi y cols., 1988; Murai y cols., 1989). Su presencia en el corazón es predominantemente ventricular (Folander y cols., 1990) y mediante la asociación con la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 genera la  $I_{Ks}$  (Figura 22C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). También se ha descrito que puede interaccionar con las subunidades  $\alpha$  Kv11.1 y Kv4.3. Además, mutaciones en el gen que codifica la subunidad minK producen una disminución de la  $I_{Ks}$  que se relaciona con la aparición de SQT5 (Splawski y cols., 2000). Las siguientes subunidades auxiliares codificadas por genes KCNE se identificaron por homología con minK y se denominaron MiRP (*MinK-Related Peptides*) (Figura 21D) (Abbott y cols., 1999; McCrossan y Abbott, 2004). Se ha demostrado la presencia de MiRP1, MiRP2 y MiRP3 en tejido miocárdico humano, donde se ha sugerido que podrían ensamblarse con las subunidades  $\alpha$  Kv11.1, Kv7.1, Kv4.2 y Kv4.3 (Abbott y cols., 1999; Finley y cols., 2002; McCrossan y Abbott, 2004; Radicke y cols., 2006; Delpón y cols., 2008). Además, mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP1 se han relacionado con la aparición de SQT6 (Abbott y cols., 1999) y de FA (Zhang y cols., 2005), mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP2 se han relacionado con la aparición de FA (Zhang y cols., 2005) y SB (Delpón y cols., 2008), y mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP4 se han relacionado con la aparición de SB y fibrilación ventricular (FV) (Ohno y cols., 2011).

- Subunidad KChAP

La subunidad KChAP (*K<sup>+</sup> Channel-Associated Protein*) pertenece a la familia de proteínas inhibitoras del STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) activado (Wible y cols., 1998). Estas proteínas interactúan con una gran variedad de factores de transcripción e intervienen en procesos como la apoptosis (Wible y cols., 2002). La subunidad KChAP es una proteína citoplásmica que puede unirse al extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha$  Kv1, Kv2 y Kv4 (Figura 22D) (Wible y cols., 1998; Kuryshv y cols., 2000).

- Subunidades KChIP

Las subunidades auxiliares KChIP (*Kv Channel Interacting Protein*) son proteínas citosólicas relacionadas con la familia de sensores neuronales de  $Ca^{2+}$ . Se han identificado cuatro subunidades KChIP (KChIP1 a KChIP4) y diversas isoformas de varias de ellas. Estas subunidades se unen al extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha$  con una estequiometría 1:1

(Figura 22B) (Kim y cols., 2004b). La mayoría de las proteínas KChIP modifican la actividad del canal afectando a la cinética de inactivación y/o de recuperación de la inactivación (An y cols., 2000; Decher y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Wang y cols., 2007). Su distribución es heterogénea, siendo las isoformas KChIP2a, KChIP2b y KChIP2c las predominantes en el corazón (An y cols., 2000; Ohya y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Decher y cols., 2004), donde se unen a las subunidades  $\alpha$  Kv4.2 y Kv4.3 para regular su expresión en membrana y modular las propiedades cinéticas de la  $I_{to1}$  (An y cols., 2000).

- Subunidades DPPX

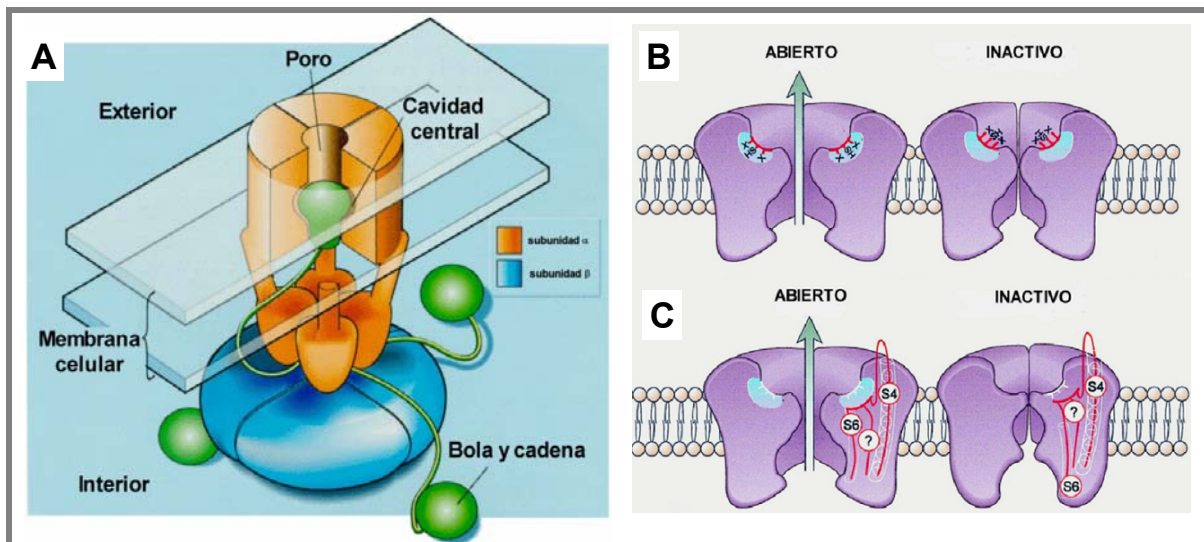
Las proteínas dipeptidilpeptidasas (DPP) pertenecen a la familia de serín-proteasas no clásicas y son glicoproteínas de membrana con un largo extremo C-terminal extracelular (Wada y cols., 1992). El primer miembro identificado de esta familia fue la proteína DPP6 (Figura 22B), del que se ha sugerido que tiene como función regular la cinética y el tráfico a la membrana de los canales Kv4 (Kin y cols., 2001; Nadal y cols., 2003), con los que interacciona siguiendo una estequiometría 1:1 (Soh y Goldstein, 2008). En neuronas, se ha propuesto que la corriente transitoria de  $K^+$  ( $I_A$ ) estaría formada por un complejo ternario 4:4:4 formado por subunidades  $\alpha$  Kv4 y subunidades auxiliares DPP6 y KChIP (Maffie y Rudy, 2008). Su presencia en el miocardio humano permite aventurar la formación de dicho complejo también en el corazón para generar la  $I_{to1}$  (Radicke y cols., 2005). Además, se ha demostrado que otro miembro de esta familia, la proteína DPP10, interacciona con los canales Kv4 en neuronas (Jerng y cols., 2004; Li y cols., 2006), por lo que su presencia en el miocardio sugiere que podría formar parte de los canales que generan la  $I_{to1}$  (Radicke y cols., 2007).

### 2.3.3.b. La inactivación de los canales Kv

El estado inactivo es un estado no conductor que la mayoría de los canales Kv alcanzan tras su activación, aunque puede alcanzarse desde el estado cerrado o sin que el canal se abra (Rasmusson y cols., 1998; Kurata y Fedida, 2006). Tanto la inactivación como la recuperación de la misma son fundamentales para determinar la contribución de cada una de las corrientes de  $K^+$  a la repolarización cardíaca. Sin embargo, no existe un único mecanismo responsable de la inactivación, sino que es un proceso que presenta propiedades diferentes dependiendo del canal estudiado.

La **inactivación tipo-N** se conoce como “modelo de la bola y la cadena”, ya que una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos del extremo N-terminal (bola), que se encuentra unida al canal a través del dominio formado por el resto de aminoácidos hasta el segmento S1 (cadena), ocluye el poro intracelular del canal e impide el paso de los iones (Figura 23A) (Zagotta y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991; MacKinnon y cols., 1993; Gómez-Lagunas y Armstrong, 1995; Lee y cols., 1996). Este mecanismo es un proceso de inactivación muy rápido (1-10 ms), por lo que también se conoce como “inactivación rápida” y se produce en canales de la familia *Shaker* (Kv1.1 y Kv1.4), *Shal* (Kv4.2 y Kv4.3) y *Shaw* (Kv3.1-3.4) (Coetzee y cols., 1999).

Se ha determinado que existen alrededor de 10 aminoácidos hidrofóbicos seguidos de una serie de aminoácidos con una carga neta positiva que determinan la inactivación tipo-N. Gracias a estos datos se ha postulado que los residuos hidrofóbicos del dominio de inactivación pueden interactuar directamente con regiones hidrofóbicas del canal, probablemente en la región que une los segmentos S4 y S5 (Isacoff y cols., 1991). Pero no siempre la inactivación tipo-N se produce a través de la secuencia descrita, ya que existen subunidades reguladoras, como las subunidades  $\beta$ , que pueden interaccionar con canales, como en el caso del canal Kv1.1, dando lugar a la inactivación tipo-N de los mismos (MacKinnon y cols., 1993; Rettig y cols., 1994).



**Figura 23. Modelos de inactivación de los canales Kv.** (A) Modelo de “la bola y la cadena”. (B-C) Modelo de inactivación tipo-C: cambios conformacionales en la boca externa del poro asociados a la inactivación tipo-C (B) y cambios conformacionales adicionales que tienen lugar durante este tipo de inactivación (C), asociados fundamentalmente al S6. [Adaptadas de Aldrich, 2001 (A) y Rasmusson y cols., 1998 (B-C)]

Una importante característica de este tipo de inactivación es su sensibilidad al bloqueo por TEA y por pancuronio, sólo cuando son aplicados en la cara intracelular del poro (Choi y cols., 1991).

La eliminación de la inactivación rápida tipo-N dejó en evidencia la presencia de un proceso inactivante lento al que se denominó **inactivación tipo-C**, puesto que inicialmente se pensó que dependía específicamente del extremo C-terminal del canal (Figuras 23B y C) (Choi y cols., 1991; Hoshi y cols., 1991). Posteriormente se ha demostrado que esta inactivación depende de cambios conformacionales en la boca externa del poro que implican también la participación del filtro de selectividad (López-Barneo y cols., 1993; Rasmusson y cols., 1998). La inactivación tipo-C se diferencia de la tipo-N en que es un mecanismo en el que las cuatro subunidades del canal actúan de manera cooperativa, mientras que los dominios inactivantes tipo-N actúan independientemente (Ogielska y cols., 1995; Panyi y cols., 1995). La inactivación tipo-C, al igual que la inactivación tipo-N, es independiente de voltaje a potenciales a los que la activación es completa, lo que sugiere que están acopladas a la activación. (Hoshi y cols., 1990; Rasmusson y cols., 1995). Además, la recuperación de ambos tipos de inactivación es voltaje dependiente, debido al descenso del segmento S4 (Rasmusson y cols., 1995) de manera similar al mecanismo propuesto para el modelo de “bola y cadena” (Rasmusson y cols., 1995).

Sin embargo, la inactivación tipo-C se puede diferenciar fácilmente de la tipo-N ya que no es sensible a la perfusión intracelular con TEA (Hoshi y cols., 1991; López-Barneo y cols., 1993) y es sensible a la concentración y naturaleza del catión permeable en el medio extracelular (MacKinnon y Yellen, 1990). La cinética de la inactivación tipo-C se retrasa al aumentar la  $[K^+]_e$ , debido a la interacción del  $K^+$  con un sitio de alta afinidad situado en la cara externa del poro iónico del canal, que impide que se produzca el cierre de la boca del canal, retrasando la inactivación (López-Barneo y cols., 1993). Este mecanismo se conoce como “pie en la puerta”.

#### 2.3.3.c. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardíaco

Gracias a estudios realizados con la técnica de *patch-clamp* en miocitos auriculares y ventriculares, se han identificado al menos 4 corrientes de  $K^+$  generadas a través de canales Kv implicadas en el PA cardíaco: la  $I_{to1}$ , la  $I_{Kur}$ , la  $I_{Kr}$  y la  $I_{Ks}$ .

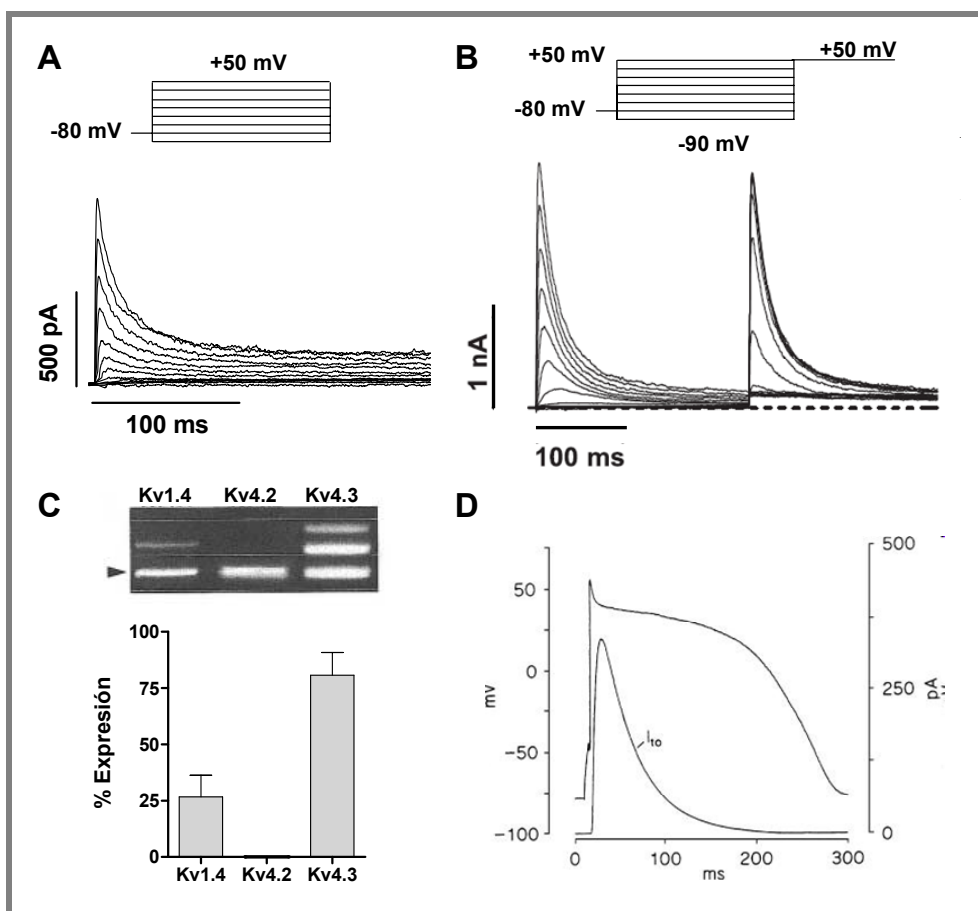


### *I. La $I_{to}$*

La corriente transitoria de salida de  $K^+$  fue descrita por primera vez en fibras de Purkinje de oveja, donde su actividad era evidente en la primera fase de repolarización del PA (Dudel, 1967; Fozzard 1973). Al principio se pensó que era una corriente debida a la entrada de  $Cl^-$ , aunque más tarde se describió que está formada en realidad por dos componentes bien diferenciados, la  $I_{to1}$  y la  $I_{to2}$ , donde sólo la  $I_{to1}$  es una corriente de  $K^+$ , sensible a 4-aminopiridina (4-AP) e independiente de  $Ca^{2+}$ , mientras que la  $I_{to2}$  es una corriente de  $Cl^-$  activada por  $Ca^{2+}$  y de menor magnitud que la  $I_{to1}$  (Siegelbaum y cols., 1977; Kenyon y Gibbons, 1979; Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Hiraoka y Kawano, 1989). La  $I_{to1}$  es responsable de la rápida repolarización del PA durante la fase 1, por lo que determina la altura y la duración de la fase de meseta (Nerbonne, 2000; Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010).

#### *I.a. Características de la $I_{to1}$*

La  $I_{to1}$  se activa (alcanza su máxima amplitud en 5-20 ms) e inactiva muy rápidamente en respuesta a una despolarización (Figura 24), siendo su reactivación también muy rápida ( $\approx 50$  ms) (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fermini y cols., 1992).



**Figura 24. Características de la  $I_{to1}$ .** (A)  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Corriente generada por canales Kv4.3-KCHIP2a registrada en células CHO en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (C) Detección por PCR de los distintos tipos de canales que generan la  $I_{to1}$  auricular humana (panel superior) y representación de la expresión relativa de su ARNm (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda de control interno. (D) Representación teórica del comportamiento de la  $I_{to1}$  durante el PA ventricular [Adaptadas de Caballero y cols., 2004 (B), Bertaso y cols., 2002 (C), Patel y Campbell, 2005 (D)]

La amplitud de la  $I_{to1}$  es dependiente de la frecuencia cardíaca, por lo que su papel en el control de la DPA es más importante a frecuencias cardíacas lentas. Además, en las células en las que coexiste con las corrientes de  $K^+$  rectificadoras tardías, la inhibición de la  $I_{to1}$  desplaza la fase 2 del PA hacia valores más positivos, lo que acelera la inactivación de la  $I_{Ca,L}$  y la activación de las corrientes de salida de  $K^+$ , dando como resultado un acortamiento de la DPA (Fermini y cols., 1992; Carmeliet, 1993; Courtemanche y cols., 1999; Burashnikov y cols., 2004).

### *I.b. Composición de los canales que generan la $I_{to1}$*

Existen dos fenotipos de corriente transitoria: una  $I_{to1}$  lenta ( $I_{to1,s}$ ) y una  $I_{to1}$  rápida ( $I_{to1,f}$ ). Ambos fenotipos se pueden distinguir en función de sus propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas (Tabla 10) (Nerbonne y Kass, 2005). Además, se observa un patrón de expresión para los dos fenotipos según la región del miocardio que se estudia: la  $I_{to1,s}$  se expresa fundamentalmente en regiones que presentan una DPA más prolongada (endocardio, ventrículo izquierdo, septo y ápex), mientras que la  $I_{to1,f}$  se expresa mayoritariamente en regiones epicárdicas, ventrículo derecho y en la base del corazón (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010).

Se han identificado tres subunidades  $\alpha$  como posibles responsables de los diferentes fenotipos de la  $I_{to1}$  (Kv1.4, Kv4.2 y Kv4.3), aunque las diferencias observadas entre la corriente generada por cada una de estas subunidades  $\alpha$  y las corrientes nativas sugieren la participación adicional de una o varias subunidades auxiliares (Tabla 10).

#### *I.b.1. Composición de la $I_{to1,s}$*

- Subunidad alfa

La subunidad  $\alpha$  Kv1.4 genera una corriente de rápida activación, con una cinética de inactivación biexponencial y una lenta recuperación de la inactivación (constante de tiempo  $\approx$  s). Además, presenta acumulación de la inactivación tras aplicar pulsos repetidos a frecuencias altas, no es sensible a la toxina Heteropoda (HPTXs) ni a las pirotoxinas (PaTXs) y la 4-AP bloquea el estado abierto de este canal (Tseng-Crank y cols., 1990; Oudit y cols., 2001; Nerbonne y Kass, 2005). Debido a todas estas características (Tabla 10), se cree que la corriente generada a través de los canales Kv1.4 es la responsable de la corriente nativa  $I_{to1,s}$  (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2009). De hecho, en miocitos ventriculares de ratones Kv1.4<sup>-/-</sup> se ha demostrado la pérdida del componente lento de la  $I_{to1}$ , pero no del componente rápido (London y cols. 1998).

- Subunidad reguladoras

Las corrientes generadas por los canales formados por 4 subunidades  $\alpha$  Kv1.4 reproducen casi todas las propiedades de la  $I_{to1,s}$  salvo la activación que se produce a potenciales mucho más negativos que la corriente nativa (Serôdio y cols., 1996), por lo que se ha sugerido que

alguna subunidad reguladora puede estar mediando en esta diferencia. Tal y como hemos mencionado las subunidades Kv $\beta$ 1 (Kv $\beta$ 1.2, Kv $\beta$ 1.3 y/o Kv $\beta$ 2) pueden interactuar con los canales Kv1.x pudiendo regular el canal (Morales y cols., 1995; Deal y cols., 1996). Así, la subunidad Kv $\beta$ 1.3 acelera los componentes rápido y lento de la inactivación y retrasa la recuperación de la inactivación del canal Kv1.4 (Castellino y cols., 1995; Morales y cols., 1995).

### 1.b.2. Composición de la $I_{to1,f}$

#### • Subunidades alfa

Las subunidades  $\alpha$  Kv4.2 y Kv4.3 generan una corriente que se activa rápidamente y que se inactiva siguiendo una cinética multiexponencial y que presenta una rápida recuperación de la inactivación, en un rango entre 10 y 100 ms, por lo que no presenta acumulación de la inactivación. Esta corriente es sensible a HPTXs y a las PaTXs y, en este caso, la 4-AP bloquea el estado cerrado del canal. (Serôdio y cols., 1996, Nerbonne 2000; Oudit y cols., 2001; Nerbonne y Kass, 2005. Además, miocitos ventriculares de ratones Kv4.2<sup>-/-</sup> presentan una reducción significativa del componente rápido de la  $I_{to1}$  (Barry y cols., 1998; Wickenden y cols., 1999). Las subunidades  $\alpha$  Kv4.2 y Kv4.3 generan una corriente cuyas propiedades farmacológicas coinciden con las observadas en la  $I_{to1,f}$  nativa (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010), pero que no mimetiza las propiedades cinéticas de la corriente a través de estos canales. Así, aunque la recuperación de la inactivación de Kv4.2 y Kv4.3 es 10 veces más rápida que la de los canales Kv1.4 o la corriente nativa  $I_{to1,s}$ , ésta sigue siendo 5 veces más lenta que la de la  $I_{to1,f}$  (Patel y Campbell, 2005), lo que sugiere la participación de subunidades auxiliares.

$I_{to}$	Canal	$\tau_{Act}$ (ms)	$\tau_{Inact}$ (ms)	$\tau_{Rec}$ (ms)	Tejido	Acción 4-AP	Especie
$I_{to1,s}$	Kv1.4	2-10	80-200	1000-2000	V	Abierto	Cj, H, Hr, R, Rta
$I_{to1,f}$	Kv4.3 Kv4.2	2-10	25-80	25-80	A, V, Purk	Cerrado	G, H, Hr, P, R, Rta

**Tabla 10. Principales características de las corrientes  $I_{to1,f}$  e  $I_{to1,s}$ .** A: Aurícula. Act: Activación. Cj: Conejo. G: Gato. H: Hombre. Hr: Hurón. Inact: Inactivación. P: Perro. Purk: Purkinje. R: Ratón. Rec: Recuperación de la inactivación. Rta: Rata. V: Ventrículo. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En el corazón humano, las subunidades  $\alpha$  Kv4.3 son las responsables de la  $I_{to1,f}$  (Dixon y cols., 1996; Kong y cols., 1998; Dilks y cols., 1999). En el ventrículo humano existen dos variantes de este canal: una isoforma larga o Kv4.3-L y una isoforma corta o Kv4.3-S (Kong

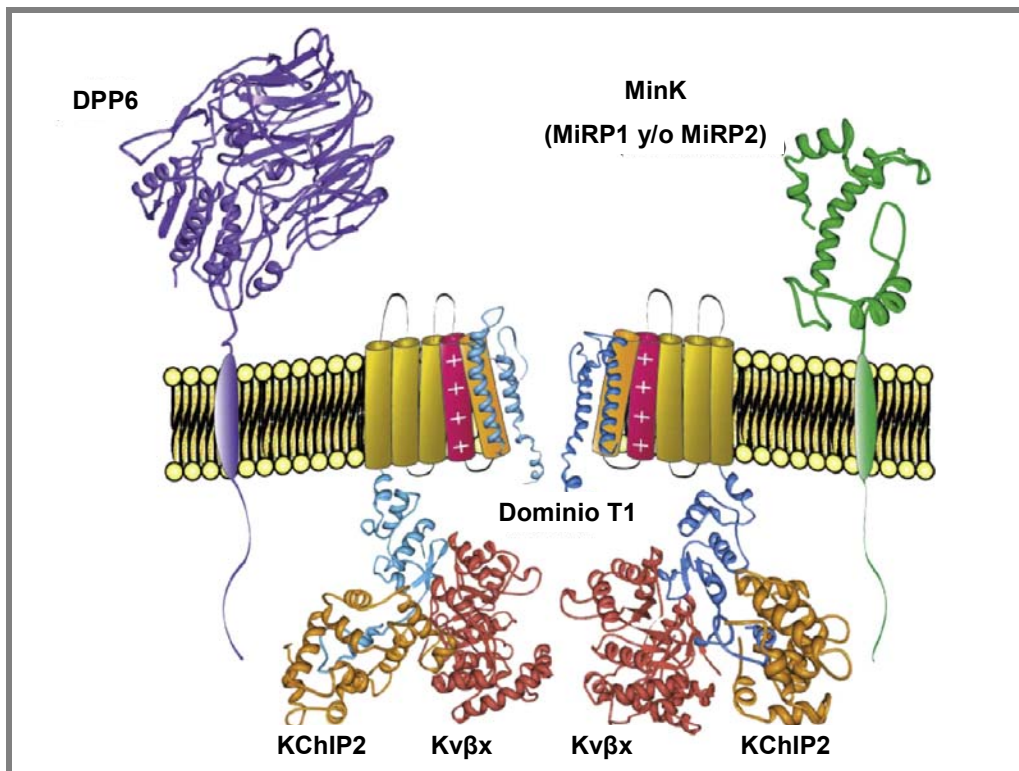
y cols., 1998). La secuencia del canal Kv4.3 está altamente conservada (la isoforma humana sólo presenta tres aminoácidos diferentes al de rata) (Dilks y cols., 1999). La dependencia de voltaje de las variantes de hKv4.3 expresadas en células CHO se asemeja a las de la  $I_{\text{to1,f}}$  registrada en miocitos ventriculares humanos (Figura 24) (Beuckelmann y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993 y 1994; Näbauer y cols., 1993 y 1996; Amos y cols., 1996). El rango de voltaje de activación y las características de la inactivación de esta corriente son similares en las corrientes nativas y en los canales clonados, apareciendo a potenciales más positivos de -40 mV y con un punto medio de activación de 10 mV. (Beuckelmann y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993 y 1994; Näbauer y cols., 1993 y 1996; Amos y cols., 1996; Kong y cols., 1998).

- Subunidad reguladoras

Las primeras subunidades auxiliares que se relacionaron con la modulación de la  $I_{\text{to1,f}}$  fueron las subunidades KChIP, concretamente la KChIP2 (Bähring y cols., 2001; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001). De hecho, se ha demostrado que los ratones KChIP2<sup>-/-</sup> no presentan  $I_{\text{to1,f}}$  (Kuo y cols., 2001). Además, el ARNm de KChIP2 en humano y perro es  $\approx 25$  veces más abundante en el epicardio que en el endocardio, lo que sugiere que la KChIP2 podría jugar un papel importante en el gradiente transmural de la  $I_{\text{to1}}$  (Rosati y cols., 2001; Zicha y cols., 2004). La coexpresión de las proteínas KChIP con canales Kv4.x incrementa de forma muy marcada la expresión de dichos canales en la membrana de la célula, lo que funcionalmente se puede observar como un aumento en la amplitud/densidad del pico de corriente sin modificar la conductancia del canal único (Bähring y cols., 2001). Además, la proteína KChIP retrasa la inactivación de la corriente y acelera la recuperación de la inactivación, pero tiene un efecto mínimo sobre la cinética y la dependencia de voltaje de la activación de los canales Kv4.x (Bähring y cols., 2001). Se sabe que los residuos del extremo N-terminal que preceden al dominio T1 de la subunidad  $\alpha$  Kv4.3 son esenciales para el ensamblaje con KChIP (Figura 24) (An y cols., 2000; Shibata y cols., 2003) y se ha propuesto que cada subunidad KChIP podría unirse lateralmente con dos dominios T1 del extremo N-terminal de cada subunidad Kv4.3 (Pioletti y cols., 2006; Wang y cols., 2007).

Las proteínas minK y MiRP modulan las propiedades cinéticas y dependientes de voltaje también cuando se coexpresan en sistemas heterólogos con los canales Kv4.2 y Kv4.3 (Figura 25) (Zhang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Lundby y Olesen, 2006; Radicke y cols., 2006 y 2008; Delpón y cols., 2008; Liu y cols., 2008). En miocitos auriculares humanos se ha descrito que MiRP2 coinmunoprecipita con los canales Kv4.3 en

experimentos realizados (Delpón y cols., 2008). En experimentos donde se expresaban de forma heteróloga estas proteínas, se observó que la subunidad MiRP2 disminuía la densidad de la corriente Kv4.3 tanto cuando se coexpresaba como cuando no, con la subunidad KChIP2 (Jiang y cols., 2004; Lundby y Olesen, 2006; Delpón y cols., 2008). Además, una mutación en la proteína MiRP2 relacionada con la aparición de SB revierte los efectos inhibitorios de esta proteína sobre los canales Kv4.3 dando lugar a un incremento de la corriente generada por este canal (Delpón y cols., 2008), lo que demuestra su importancia en la  $I_{to1,f}$  humana.



**Figura 26.** Dibujo esquemático del canal Kv4.3 con sus posibles subunidades auxiliares. [Adaptada de Niwa y Nerbonne, 2010]

Las glicoproteínas DPP6 y DPP10 regulan y se coexpresan con los canales Kv4.2 y Kv4.3 en neuronas (Figura 26) (Nadal y cols., 2003; Jerng y cols., 2004; Li y cols., 2006), por lo que su presencia en el miocardio humano sugiere también su posible participación en la  $I_{to1,f}$  (Radicke y cols., 2005 y 2007). Se ha descrito que su coexpresión aumenta la expresión en la superficie celular de subunidades  $\alpha$  Kv4, desplaza la dependencia de voltaje de la activación e inactivación hacia potenciales más negativos y que acelera la activación, inactivación y recuperación de la inactivación del canal. (Nadal y cols., 2003; Radicke y cols., 2005; Amarillo y cols., 2008).

Por último, las subunidades Kv $\beta$ 1, Kv $\beta$ 2, Kv $\beta$ 3, KChAP y Nav $\beta$ 1 también son capaces de modular los canales Kv4.2 y Kv4.3 *in vitro* (Figura 24) (Wible y cols., 1998; Pérez-García y

cols., 1999; Kuryshev y cols., 2000; Yang y cols., 2001). Se ha descrito que las subunidades Kv $\beta$  aumentan la expresión de los canales Kv4.3 sin alterar sus propiedades cinéticas (Yang y cols., 2001). La subunidad  $\beta 1$  del canal de Na<sup>+</sup> puede interactuar con el canal Kv4.3 produciendo un aumento en la densidad del pico de la corriente, una aceleración de la inactivación y un retraso en la recuperación de la inactivación (Deschênes y Tomaselli, 2002; Deschênes y cols., 2008).

### *I.c. Regulación de la $I_{to1}$*

La fosforilación, tanto a través de la proteína kinasa A (PKA) como de la proteína kinasa C (PKC), altera las propiedades del canal que genera la  $I_{to1}$ , modificando tanto la cinética como la expresión del canal en la membrana celular (Tamargo y cols., 2004b; Patel y cols., 2005). El activador inespecífico de la serina/treonina y tirosina quinasa PMA inhibe la corriente generada a través de los canales Kv4.2 y Kv4.3 al igual que la corriente nativa  $I_{to1}$ , efecto que se suprime mediante la acción de la queleritrina (inhibidor de la PKC) o de la estaurosporina (inhibidor inespecífico de las serina/treonina quinasas). La activación de la PKC aumenta las constantes de tiempo de inactivación y retrasa el curso temporal de la recuperación de la inactivación de la  $I_{to1}$  (Nakamura y cols., 1997). Es probable que la isoforma de la PKC que está mediando en la regulación tanto de canales Kv4.3 como de la corriente nativa  $I_{to1}$  sea la  $\alpha$  (Scholz y cols., 2011).

La CaMKII juega también un importante papel en la regulación de la  $I_{to1}$ , acelerando la inactivación de los canales que generan esta corriente y retrasando la recuperación de la misma (Tessier y cols., 1999; Colinas y cols., 2006). Se ha descrito también que la regulación de la  $I_{to1}$  por esta quinasa depende de la expresión de otro tipo de proteínas denominadas guanilato-quininas asociadas a membrana (MAGUKs), en concreto la SAP97 que se expresa en miocardio (El-Haou y cols., 2009) y que se ha demostrado que interacciona con otros canales dependientes de voltaje de la familia Shaker (Leonoudakis y cols., 2001; Godreau y cols., 2002; El-Haou y cols., 2009; Milstein y cols., 2012). Además diversos mediadores celulares como la endotelina-1, los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos y la angiotensina II, modulan la expresión y la magnitud de la  $I_{to1}$ . Los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos reducen la  $I_{to1}$  en miocitos ventriculares de rata (Apkon y Nerbonne, 1988). La fenilefrina y el carbachol sólo inhiben la corriente generada por el canal Kv4.3 cuando éste se coexpresa con  $\alpha 1$ -adrenoreceptores o receptores M1, respectivamente, lo que sugiere que el efecto estaba mediado por la activación

de la PKC (Nakamura y cols., 1997). Por otra parte, la angiotensina II inhibe la  $I_{to1}$  en miocitos ventriculares de rata, efecto que se prevenía por el PD123391, un antagonista selectivo de receptores de angiotensina II (AT2). Esta inhibición se suprimía con ácido okadaico, un inhibidor de la serin-treonina-fosfatasa 2A, sugiriendo que la estimulación de los receptores AT2 inhiben la  $I_{to1}$  a través de la desfosforilación producida por esta fosfatasa (Caballero y cols., 2004).

#### *I.d. Propiedades farmacológicas de la $I_{to1}$*

Como se ha mencionado anteriormente, la  $I_{to,f}$  y la  $I_{to,s}$  se pueden diferenciar atendiendo a su sensibilidad farmacológicas. La 4-AP bloquea los dos componentes, pero lo hace de manera significativamente diferente. El bloqueo de la  $I_{to,s}$  presenta las características clásicas de un bloqueo de estado abierto del canal, es decir, produce un bloqueo uso-dependiente con un bloqueo tónico mínimo y una aceleración de la inactivación. Sin embargo, la 4-AP bloquea el estado cerrado del canal que genera la  $I_{to,f}$ . El bloqueo del estado cerrado no sólo se manifiesta en la reducción de la amplitud del pico de la  $I_{to,f}$ , sino que también es apreciable en el enlentecimiento de la cinética de activación e inactivación (Campbell y cols., 1993a y b; Patel y Campbell, 2005). El uso de diversas toxinas también permite la identificación del fenotipo de la  $I_{to1}$ . La HPTX, (150 nM) no presenta ningún efecto sobre la  $I_{to,s}$  registrada en miocitos endocárdicos de hurón y ventriculares de ratón; sin embargo inhibe significativamente la  $I_{to,f}$  de miocitos epicárdicos registrada en las mismas especies (Guo y cols., 1999; Xu y cols., 1999). Las PaTXs también interactúan específicamente con la  $I_{to,f}$  (Diochot y cols., 1999).

La quinidina y la propafenona producen un bloqueo del estado abierto del canal y aceleran la inactivación de la  $I_{to1}$  (Wang y cols., 1995b). Además la quinidina produce un bloqueo frecuencia-dependiente de la  $I_{to1}$  que es consecuencia de una lenta disociación del fármaco del canal (Slawsky y Castle, 1994; Wang y cols., 1995b). El vernakalant también reduce la  $I_{to1}$  de forma frecuencia-dependiente haciendo que en pacientes que presentan taquiarritmias auriculares se produzca una prolongación selectiva de la repolarización de la aurícula (Tian y Frishman, 2011)

Se ha propuesto que los bloqueantes de la  $I_{to1}$  prolongan la DPA en miocitos auriculares humanos (Shibata y cols., 1989) y en músculo isquémico ventricular (Mubagwa y cols., 1994). Sin embargo, el bloqueo de la  $I_{to1}$  puede despolarizar el  $E_m$  de la fase de meseta lo que



puede favorecer la inactivación de la  $I_{CaL}$  y acelerar la activación de las corrientes de salida de  $K^+$  rectificadoras tardías. En consecuencia, la reducción de la densidad de la  $I_{to1}$  puede resultar en un acortamiento de la DPA ventricular (Shibata y cols., 1989; Mubagwa y cols., 1994; Oudit y cols., 2001).

Además, la distribución heterogénea de la corriente puede aumentar la disparidad de la DPA e incluso puede iniciar o perpetuar las arritmias por reentrada (Antzelevitch y cols., 1991).

### *I.e. La $I_{to1}$ en diversas patologías*

En situaciones como la insuficiencia cardíaca, la hipertrofia cardíaca, la isquemia miocárdica y el infarto de miocardio se produce una prolongación de la DPA (Kääb y cols., 1998; Tomaselli y Marbán, 1999; Oudit y cols., 2001). En la hipertrofia cardíaca, esta prolongación se correlaciona con una disminución de la  $I_{to1}$  y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 (Potreau y cols., 1995; Meszaros y cols., 1996; Nattel y cols., 2010). También se ha descrito una disminución de la  $I_{to1}$  y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 tras infarto de miocardio (Kaprielian y cols., 1999; Huang y cols., 2000).

De igual forma, tanto la  $I_{to1}$  como la expresión de Kv4.3 se encuentran significativamente disminuidas en pacientes con FA (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Grammer y cols., 2000; Workman AJ y cols., 2001; Michael G y cols., 2009; Nattel y cols., 2010).

De forma teórica se había postulado que el SB podría ser consecuencia de una disminución de las corrientes despolarizantes ( $I_{Na}$  e  $I_{CaL}$ ) o de un aumento de las repolarizantes ( $I_{to1}$ ) que actúan durante la fase de meseta del PA (Di Diego y cols., 2002). Recientemente se ha identificado la primera mutación en KCND3 que produce un aumento de función implicada en la aparición de SB tipo 10 (Cerrone y Priori, 2011). Esta mutación produce un aumento en la densidad del pico de la  $I_{to1}$  en el ventrículo izquierdo precisamente donde la expresión de KCND3 es mayor (Giudicessi y cols., 2011).

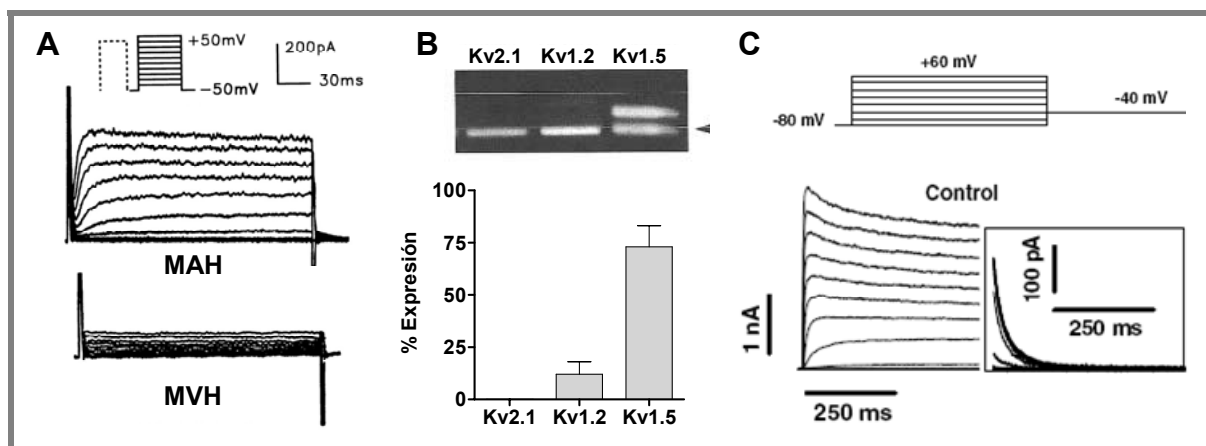
## II. La $I_{Kur}$

Las células auriculares presentan una corriente de salida de  $K^+$  denominada  $I_{Kur}$  que se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). Su exclusiva presencia en el tejido auricular contribuye a que la DPA en este tejido sea más breve que en el ventricular (Feng y cols., 1998b; Tamargo y cols., 2009; Barana y cols., 2010).

### II.a. Características de la $I_{Kur}$

La  $I_{Kur}$  se activa rápidamente ( $<10$  ms) y presenta una inactivación parcial o incluso no se inactiva en absoluto durante el curso temporal del PA (Figura 28A) (Apkon y Nerbonne, 1991; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b; Tamargo y cols., 2004b). La recuperación de la inactivación también es un proceso muy lento, lo que tiene gran importancia para explicar la dependencia de frecuencia de esta corriente a potenciales de membrana fisiológicos (Feng y cols., 1998a y b).

En humanos, la  $I_{Kur}$  se ha registrado en el tejido auricular, pero no en el ventricular (Figura 28A) (Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b), por lo que se ha propuesto como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de arritmias auriculares (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009).



**Figura 28. Características de la  $I_{Kur}$ .** (A)  $I_{Kur}$  registrada en miocitos auriculares humanos (MAH) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Tras aplicar el mismo protocolo en miocitos ventriculares humanos (MVH), la  $I_{Kur}$  no aparece. (B) Detección por PCR de canales Kv que generan corrientes tipo  $I_{Kur}$  en muestras auriculares humanas (panel superior) y representación de la expresión relativa del ARNm de cada uno (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda del control interno. (C) Corriente generada por canales Kv1.5 humanos expresados en células *Ltk* tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. [Adaptadas de Li y cols., 1996b (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Gómez y cols., 2005 (C)]

### II.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kur}$

Existen diversas subunidades  $\alpha$  Kv que generan corrientes similares a la  $I_{Kur}$  (Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv3.1), que difieren en sus propiedades farmacológicas (Tabla 12). La sensibilidad a 4-AP y la resistencia al TEA y a la dendrotoxina (DTX) de la  $I_{Kur}$  humana y de ratón parecen indicar que es la subunidad  $\alpha$  Kv1.5 la responsable de generar esta corriente en ambas especies (Nattel y cols., 1999). Por el contrario, en el perro (Kv3.1) o en la rata (Kv1.2 en aurículas y Kv2.1 en ventrículos) parecen estar implicadas otras subunidades  $\alpha$  Kv (Roberds y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Grissmer y cols., 1994; Mathie y cols., 1998).

Subunidad $\alpha$	Gen	4-AP ( $\mu$ M)	TEA (mM)	DTX (nM)	CTX (nM)
<b>Kv1.2</b>	<b>KCNA2</b>	200-800	10-560	1-17	14
<b>Kv1.5</b>	<b>KCNA5</b>	50-250	330	>200	>100
<b>Kv2.1</b>	<b>KCNB1</b>	500	6-10		
<b>Kv3.1</b>	<b>KCNC1</b>	29	0.1-0.2	>1000	>1000

**Tabla 12. Propiedades farmacológicas de los distintos canales Kv responsables de la  $I_{Kur}$ .** 4-AP: 4-Aminopiridina. CTX: Caribdoxina. DTX: Dendrotoxina. TEA: Tetraetilamonio. [Adaptada de Nattel y cols., 1999]

La expresión de canales Kv1.5 humanos en sistemas heterólogos permite registrar una corriente rectificadora tardía que presenta las características biofísicas y farmacológicas de la  $I_{Kur}$  (Figura 27). Aunque la proteína Kv1.5 se expresa en igual proporción en aurícula y en ventrículo humano, sólo forma canales funcionales en la aurícula (Fedida y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b). Además, en miocitos auriculares humanos cultivados en los que se usan oligonucleótidos antisentido contra el ARNm de la subunidad Kv1.5 no se registra la  $I_{Kur}$  (Feng y cols., 1997b), confirmando el papel de Kv1.5 en la corriente nativa.

Se ha descrito que las subunidades  $\alpha$  de la familia Kv1 se pueden asociar con miembros de la familia de subunidades Kv $\beta$  (England y cols., 1995; Accili y cols., 1997; Martens y cols., 1999), siendo las subunidades Kv $\beta$ 1 y Kv $\beta$ 2 las que se expresan en el miocardio humano (McCormack y cols., 1999). Cuando se coexpresan con Kv1.5, las subunidades Kv $\beta$ 1 participan en la regulación del canal proporcionando sitios de interacción para quinasas (PKA, PKC) (Kwak y cols., 1999) y modificando la inhibición producida por diferentes fármacos como la quinidina o la bupivacaína (González y cols., 2002). Por su parte, la asociación de la subunidad Kv $\beta$ 2.1 con canales Kv1.5 disminuye la expresión en la membrana, aumenta el grado de la inactivación lenta y desplaza el punto medio de la curva de activación hacia potenciales más negativos (Uebele y cols., 1996; Accili y cols., 1997).

### *II.c Regulación de la $I_{Kur}$*

El canal Kv1.5 y las subunidades Kv $\beta$  poseen múltiples sitios consenso de fosforilación para la PKA y la PKC.

Distintos estudios indican que la coexpresión de Kv $\beta$ 1.3 con el canal Kv1.5 es necesaria para el aumento de la corriente mediado por PKA (Kwak y cols., 1999) mientras que la subunidad Kv $\beta$ 1.2 aumenta el efecto inhibitorio mediado por PKC (Williams y cols., 2002).

La coexpresión de los canales Kv1.5 con receptores que estimulan la fosfolipasa C (PLC), como son el receptor humano de trombina y el 5-HT, disminuye la amplitud de la  $I_{Kur}$  sin modificar la cinética ni la dependencia de voltaje de la activación (Timpe y Fantl, 1994). La inyección simultánea de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y Miristato-acetato de forbol (PMA) reproduce esta modulación, sugiriendo que estos receptores pueden modular el canal Kv1.5 al activar la PLC.

Además, los canales Kv1.5 también pueden ser regulados por el NO a través de la vía GMPc/PKG. Donadores de óxido nítrico (NO) como el SNAP disminuyen la corriente generada por estos canales de manera concentración-dependiente (Núñez y cols., 2006).

### *II.d. Propiedades farmacológicas de la $I_{Kur}$*

La  $I_{Kur}$  es una corriente relativamente insensible a TEA, Ba<sup>2+</sup>, antiarrítmicos de la clase III y algunas de las metanosulfonidas, pero es altamente sensible a 4-AP (Snyders y cols. 1993; Wang y cols. 1993; Grissmer y cols., 1994; Wang y cols., 1995b; Feng y cols., 1997; Tamargo y cols., 2004b). La inhibición selectiva de  $I_{Kur}$  con 4-AP, prolonga la DPA en el tejido auricular humano pero no modifica el periodo refractario ventricular en el perro.

Los estudios de mutagénesis han demostrado que los residuos Thr507, Leu510, Val514 del S6 son críticos en la unión de quinidina (Yeola y cols., 1996), benzocaína (Caballero y cols., 2002) y bupivacaína (Franqueza y cols., 1997). Pero también se ha demostrado que en la boca externa del canal formada por el lazo P y por las regiones adyacentes de los segmentos S5 y S6 se encuentran diversos sitios de unión para fármacos (Carmeliet, 1993; Nerbonne, 2000; Tamargo y cols., 2004b).

Dado que la  $I_{Kur}$  es una corriente exclusivamente auricular, en los últimos años se ha propuesto que los fármacos que actúen como inhibidores selectivos de la misma, podrían ser útiles para el tratamiento de las arritmias auriculares y que además carecerían de efectos

adversos a nivel ventricular (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002). Los principales inhibidores selectivos de la  $I_{Kur}$  que se han identificado son NIP-142, S9947, AVE0118, S0100176, S20951 y vernakalant. Estas moléculas no modifican el intervalo QT, prolongan significativamente el periodo refractario auricular (izquierdo > derecho) y disminuyen la vulnerabilidad de la aurícula izquierda (AI) e incluso revierten la FA a RS (Matsuda y cols., 2001; Brendel y Peukert, 2002; Knobloch y cols., 2002; Blaauw y cols., 2004; Dorian y cols., 2007). Desafortunadamente, existen pocos datos clínicos sobre la seguridad y eficacia de estos fármacos. Sin embargo existen datos esperanzadores. Wettwer y colaboradores demostraron que el bloqueo de la  $I_{Kur}$ , tanto por el 4-AP como por el AVE0118, desplazaba a potenciales más positivos la fase de meseta del PA tanto en pacientes en RS como en pacientes con FA (Wettwer y cols., 2004). Además, ambos fármacos prolongan la DPA en pacientes con FA, no así en pacientes en RS.

### *II.e. La $I_{Kur}$ en diversas patologías*

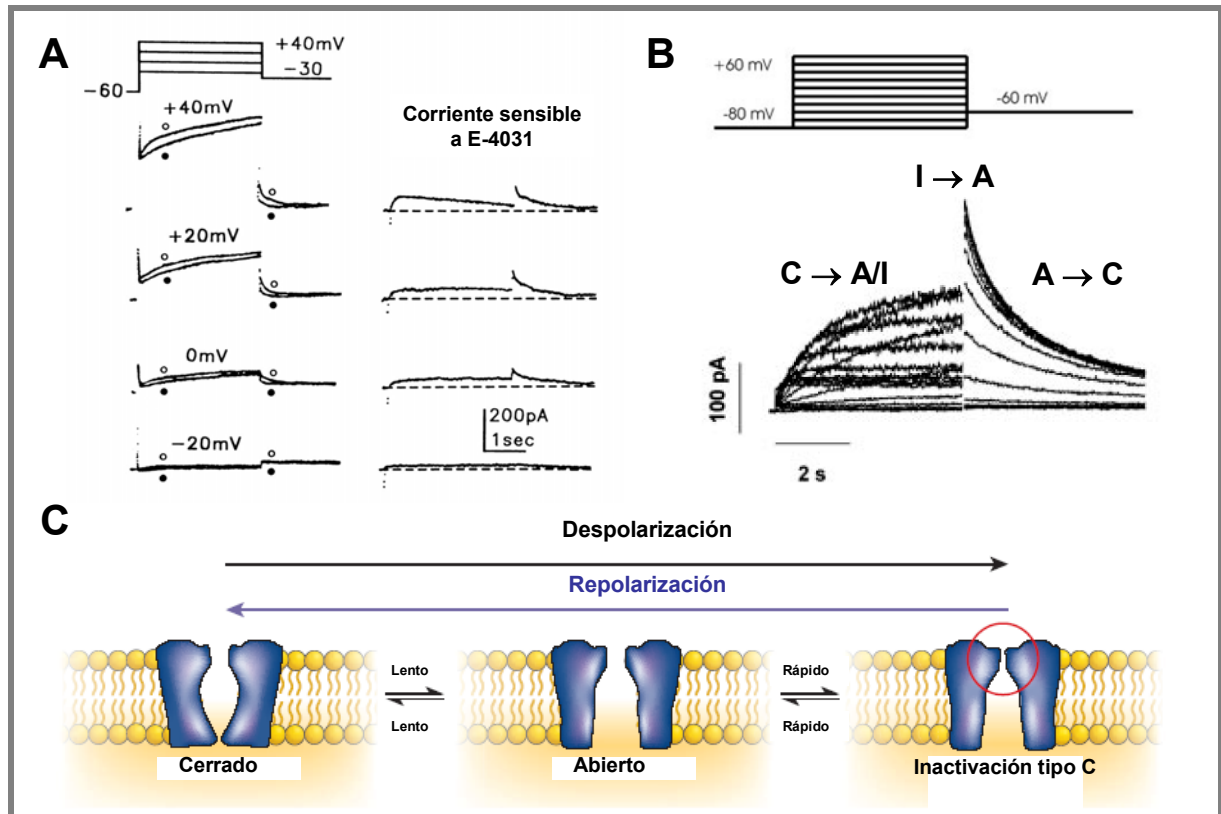
En ratas, tras infarto de miocardio, la expresión del gen Kv2.1 disminuye con los correspondientes cambios en la corriente (Qin y cols., 1996).

Por otro lado, se ha identificado un polimorfismo en la región C-terminal del canal (Pro532Leu) que aparece con una frecuencia de 1.1% en la población afroamericana (Drolet y cols., 2005; Simard y cols., 2005). En estos individuos la  $I_{Kur}$  generada es prácticamente idéntica a la nativa, sin embargo presenta una sensibilidad menor a fármacos antiarrítmicos como quinidina y propafenona (Simard y cols., 2005). También se ha descrito una mutación (Glu375X) en el gen KCNE5 que produce una pérdida de función del canal Kv1.5 y que se relaciona con la aparición de FA familiar tipo 7 (Olson y cols., 2006).

### *III. La $I_{Kr}$*

El componente rápido de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía contribuye a la fase 3 de la repolarización y juega un importante papel en el control de la DPA y del periodo refractario (Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004b, Sanguinetti, 2010). La importancia de la  $I_{Kr}$  se ha puesto de manifiesto gracias a diferentes patologías en las que se producen mutaciones tanto en la subunidad  $\alpha$  (Sanguinetti y cols., 1995 y 1996a) como en las subunidades  $\beta$  (Abbott y cols., 1999), que se pueden manifestar como SQTL

congénitos o adquiridos (Splawski y cols., 2000; Tamargo, 2000) y que se han relacionado con un aumento del riesgo de sufrir arritmias. Además, la  $I_{Kr}$  es la diana terapéutica de los fármacos antiarrítmicos de clase III (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Spector y cols., 1996a; Nattel y Singh, 1999).



**Figura 30. Características de la  $I_{Kr}$ .** (A) Corriente registrada en miocitos ventriculares humanos en ausencia (○) y en presencia (●) de E-4031 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior izquierda y corriente sensible al E-4031 correspondiente a la  $I_{Kr}$ , (derecha). (B) Registro de la corriente generada por subunidades Kv11.1 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Se muestran las transiciones entre las diferentes conformaciones del canal (A: Activo. C: Cerrado. I: Inactivo). (C) Representación esquemática de los distintos estados del canal Kv11.1. [Adaptadas de Li y cols., 1996a (A), Caballero y cols., 2003 (B) y Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006 (C)]

### III.a. Características de la $I_{Kr}$

La amplitud de la  $I_{Kr}$  va aumentando progresivamente con la despolarización del  $E_m$  hasta alcanzar un máximo a potenciales entre 0 y +10 mV. A potenciales más positivos, la amplitud disminuye debido a que la inactivación del canal tiene lugar más rápidamente que la activación (Figura 30) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Li y cols., 1996a; Spector y cols., 1996b; Smith y cols., 1996; Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001). Sin embargo, cuando la repolarización alcanza valores de  $E_m$  negativos (en la fase 3 del PA), los canales que generan la  $I_{Kr}$  se recuperan rápidamente de la inactivación y vuelven a entrar en el estado abierto (la

velocidad de recuperación de la inactivación a través del estado abierto es más rápida que la de deactivación), lo que da lugar a una corriente de gran tamaño que facilita la repolarización final del PA (Figura 30) (Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001). Por todo ello, el grado de activación de la  $I_{Kr}$  durante la fase 2 viene determinado por la dependencia de voltaje y de tiempo de la activación de los canales, mientras que en la fase 3 su participación está determinada por la recuperación de la inactivación y la deactivación de los mismos (Tseng, 2001). Tanto las características biofísicas como la distribución de los canales que generan la  $I_{Kr}$  son especie-específicas. Así, la densidad de la  $I_{Kr}$  en el miocardio humano es mayor en el ventrículo que en la aurícula, mientras que en la rata y el cobayo ocurre lo contrario (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991; Pond y cols., 2000; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004b).

### *III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$*

La subunidad  $\alpha$  Kv11.1 (antiguamente denominada hERG, *human ether-à-go-go related gene*) es la responsable de la generación de la  $I_{Kr}$  (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991). Además de en el miocardio, esta subunidad se expresa en SN, músculo liso y células tumorales (Curran y cols., 1995; Tseng, 2001). La subunidad Kv11.1 presenta, al menos, dos isoformas debidas a modificaciones postranscripcionales en su extremo N-terminal (hERG1a y hERG1b) con diferentes propiedades biofísicas (London y cols., 1997; Wang y cols., 2000b), y se piensa que ambas isoformas se ensamblan en el miocardio para formar un canal heterotetramérico (Jones y cols., 2004). Sin embargo, la  $I_{Kr}$  nativa y la corriente generada por los canales Kv11.1 ( $I_{Kv11.1}$ ) expresados en sistemas heterólogos se diferencian en el *gating* y la conductancia del canal, así como en la regulación por la  $[K^+]_e$  (Tseng, 2001; Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 2003), sugiriendo la participación de subunidades auxiliares en la generación de esta corriente.

La utilización de oligonucleótidos antisentido contra el ARNm de minK producía una disminución en la amplitud de la  $I_{Kr}$  en células AT-1, una línea tumoral de miocitos auriculares, lo que sugiere la implicación de esta subunidad en la formación de los canales que generan esta corriente (Yang y cols., 1995). De hecho, la amplitud de la  $I_{Kr}$  era significativamente menor en los cardiomiocitos de ratones minK<sup>-/-</sup> que en los de ratones control. Además, la posterior coexpresión de minK en dichos miocitos producía el aumento de la  $I_{Kr}$  (Kupersmidt y cols., 1999). La coexpresión de minK también aumentaba la

amplitud de la  $I_{Kv11.1}$  en células HEK293 (*Human embryonic kidney cells*) (McDonald y cols., 1997).

Por otro lado, las subunidades Kv11.1 y MiRP1 son capaces de formar complejos estables *in vitro* (Abbott y cols., 1999; Cui y cols., 2000). MiRP1 se expresa en fibras de Purkinje y células del nodo del seno, mientras que a nivel auricular y ventricular su expresión es muy baja (Lundquist y cols., 2005), por lo que se ha sugerido que sólo interacciona con las subunidades  $\alpha$  Kv11.1 en el sistema de conducción (Weerapura y cols., 2002). La importancia de MiRP1 en la generación de la  $I_{Kr}$  se ha puesto de manifiesto tras la descripción de mutaciones en el gen que codifica esta proteína, ya que producen la disminución de la  $I_{Kr}$  y se relacionan con la aparición de SQT6 (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

### *III.c. La $I_{Kr}$ en diversas patologías*

En un modelo canino de infarto, la densidad de la  $I_{Kr}$  y los niveles de ARNm de Kv11.1 se encuentran reducidos en miocitos ventriculares (Jiang y cols., 2000). Sin embargo, 48 horas después del infarto, la densidad de la  $I_{Kr}$  aumenta en las células de Purkinje subendocárdicas, generando un gradiente en la repolarización ventricular. Esta heterogeneidad en la repolarización puede aumentar los efectos proarrítmicos de ciertos fármacos en pacientes con infarto de miocardio. Además, tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia inhiben la corriente generada por canales Kv11.1 y pueden causar prolongación del QT y arritmias ventriculares, ya que el ATP proveniente de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa es crítico para la función de estos canales (Zhang y cols., 2003).

### *III.d. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv11.1 y MiRP1*

Diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv11.1 y MiRP1 se han relacionado con la aparición de SQT, SQT tipo 1 y FA familiar tipo 2.

Se conocen más de 200 mutaciones en el gen que codifica la subunidad Kv11.1 (KCNH2) asociadas al SQT (SQT2). El SQT2 representa un 25-30% de los casos de SQT y es el que mayor mortalidad presenta (Roberts, 2006). Todas las mutaciones identificadas producen una disminución de la  $I_{Kr}$  ocasionada por la pérdida/disminución en la función del canal Kv11.1 (Curran y cols., 1995; Zhou y cols., 1998; Splawski y cols., 2000; Tseng, 2001;



Rajamani y cols., 2002; Kass y Moss, 2003; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006, Sanguinetti, 2010; Amorós y cols., 2011). Una de ellas ha sido descrita recientemente por nuestro grupo. Caracterizamos una mutación sin sentido asociada a SQT2 producida por la sustitución de un Glu por una Gly en la posición 637 identificada en una familia española. Esta mutación abolía la rectificación interna mediante la supresión de la inactivación tipo C del canal Kv11.1 y eliminaba la selectividad por el  $K^+$ . Estas alteraciones producían una marcada disminución de la amplitud de la corriente durante el PA lo que explicaba la prolongación del intervalo QT que se observaba en los pacientes que presentaban esta mutación (Amorós y cols., 2011). También se han descrito mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP1 (KCNE2) asociadas a la aparición del SQT6 (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

La inhibición farmacológica de la  $I_{Kr}$  está relacionada con la aparición de un tipo de SQT que se denomina “SQT adquirido” (De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Esta disminución de la  $I_{Kr}$  debida a fármacos está relacionada tanto con el bloqueo de los canales Kv11.1 que la generan (Mitcheson y cols., 2000), como con la inhibición del transporte a membrana de los mismos (Dennis y cols., 2007). En ambos casos, se produce un aumento de la DPA ventricular que prolonga el intervalo QT y el periodo refractario y favorece el desarrollo de pospotenciales tempranos (Sanguinetti y cols., 1996a; De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Además, la prolongación de la DPA es mayor en las células M que en el tejido subepicárdico y subendocárdico del ventrículo, lo aumenta la dispersión de la repolarización ventricular (Haverkamp y cols., 2000; Tseng, 2001; Redfern y cols., 2003).

Por último, existen mutaciones en el gen KCNH2 relacionadas con la aparición del SQT tipo 1 (SQT1) (Brugada y cols., 2004). El SQT se caracteriza por un acortamiento del intervalo QT del ECG (<300 ms) y una marcada aceleración de la repolarización lo que predispone a padecer FA, FV y/o muerte súbita (Gussak y cols., 2000; Brugada y cols., 2004; Bjerregaard y Gussak, 2005). Hasta ahora se han descrito dos mutaciones relacionadas con el SQT1, la sustitución de una Asn por una Lys en la posición 588 y la sustitución de una Thr por una Ile en la posición 618 (Gaita y cols., 2003; Brugada y cols., 2004; Hong y cols., 2005; Sun y cols., 2011). Ambas mutaciones producen un aumento de la corriente de salida de  $K^+$ , lo que se traduce en un acortamiento del intervalo QT (Brugada y cols., 2004; Schimpf y cols., 2005).

#### *IV. La $I_{Ks}$*

El componente lento de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía participa fundamentalmente en la fase 3 de los PA auriculares y ventriculares (Jespersen y cols., 2005; Tamargo y cols., 2004b). La importancia de la  $I_{Ks}$  en la repolarización se pone de manifiesto porque las mutaciones en los genes que codifican los canales que generan esta corriente están relacionadas con la aparición de diversos síndromes arritmogénicos (SQTL, SQTC, FA).

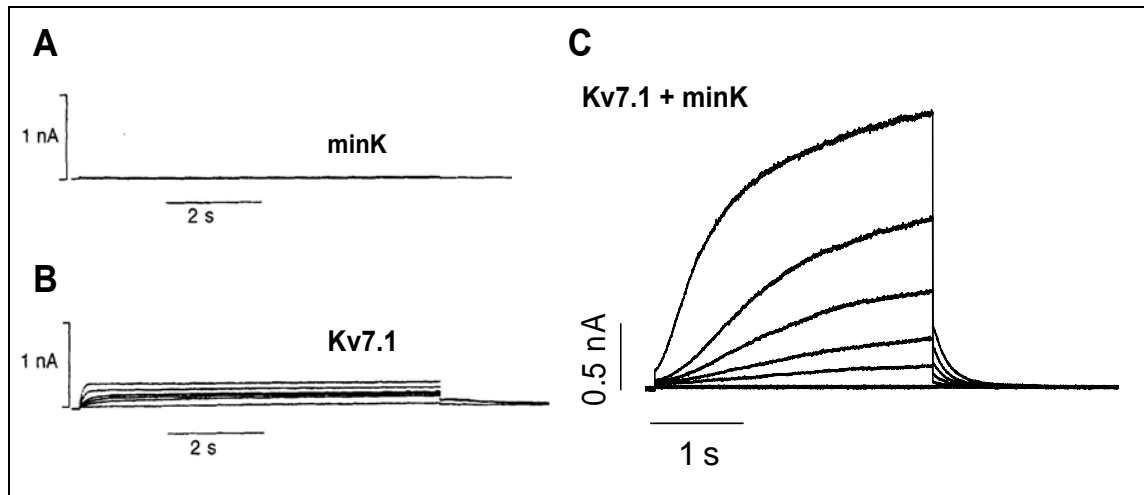
##### *IV.a. Características de la $I_{Ks}$*

La  $I_{Ks}$  se activa a potenciales más positivos de -30 mV, alcanza la mitad de su activación máxima a +20 mV (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Kurokawa y cols., 2001). La cinética de activación de la  $I_{Ks}$  es muy lenta y su amplitud máxima en estado estable (unas 10 veces mayor que el de la  $I_{Kr}$ ) sólo se alcanza con despolarizaciones extremadamente prolongadas (Mitcheson y Sanguinetti, 1999), mientras que su cinética de deactivación es también muy lenta y dependiente de voltaje (Virag y cols., 2001). La  $I_{Ks}$  es la principal responsable del control de la DPA ventricular a frecuencias rápidas, ya que, al aumentar la frecuencia cardíaca, los canales que generan la  $I_{Ks}$  tienen menos tiempo para desactivarse y se acumulan en el estado abierto, propiciando una repolarización más rápida y el acortamiento de la DPA (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Delpón y cols., 1995).

##### *IV.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$*

La subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (antiguamente denominada KvLQT1) se ensambla con la subunidad auxiliar minK para generar una corriente que se activa lentamente y cuyas características se corresponden con las de la  $I_{Ks}$  nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). La expresión en sistemas heterólogos de la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 genera una corriente ( $I_{Kv7.1}$ ) que se activa rápidamente y se inactiva lentamente (Figura 31B) y cuyas características son claramente diferentes a las de la  $I_{Ks}$  nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b; Lee y cols., 1997). Por otro lado, la expresión de minK por sí sola no forma ningún canal funcional (Figura 31A). Sin embargo, la coexpresión de ambas subunidades produce un incremento de la corriente generada, un retraso de la activación del canal y la desaparición de la inactivación, de manera que se obtiene una corriente con

características muy similares a las de la  $I_{Ks}$  nativa (Figura 31C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). Además, la presencia de minK modifica la sensibilidad al pH intracelular y a la temperatura (Unsold y cols., 2000) y aumenta la conductancia de los canales Kv7.1 (Pusch, 1998), así como su afinidad tanto por los inhibidores (cromanol 293B, HMR-1556, XE991) como por los activadores (el ácido mefenámico y los ácidos láurico, oléico y docosahexanoico) de la  $I_{Ks}$  (Busch y cols., 1997; Unsold y cols., 2000; Wang y cols., 2000a). Actualmente se acepta que la  $I_{Ks}$  se genera a través de canales formados por 4 subunidades  $\alpha$  Kv7.1 ensambladas con, al menos, 2 subunidades auxiliares minK (Chen y cols., 2003a) a través de un dominio en la región C-terminal de Kv7.1 (Schmitt y cols., 2000).



**Figura 31. Características de la  $I_{Ks}$ .** (A y B) Corrientes registradas en células de mamífero transfectadas sólo con las subunidades minK (A) y Kv7.1 (B). (C) Corriente registrada en nuestro laboratorio con ambas subunidades a la vez. [Adaptadas de Sanguinetti y cols., 1996b (A y B)]

Hasta el momento se han identificado en el corazón 6 isoformas diferentes de Kv7.1 debidas a modificaciones postranscripcionales, siendo las isoformas 1 y 2 las de mayor expresión en el miocardio (Lee y cols., 1997; Pereon y cols., 2000). Además, se ha descrito que la subunidad Kv7.1 puede asociarse *in vitro* con los otros 4 miembros de la familia de proteínas codificadas por los genes KCNE (MiRP1 a MiRP4) (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

#### *IV.c. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv7.1 y minK*

Diferentes mutaciones en los genes KCNQ1 y KCNE1, que codifican las subunidades Kv7.1 y minK, respectivamente, se han relacionado con la aparición de SQTl tipos 1 y 5, Síndrome de Jarwel Langer Nielsen (SJLN), SQTc tipo 2 y FA familiar tipo1 (Cerrone y Priori, 2011).

Los SQTl asociados a la  $I_{Ks}$  se deben a mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv7.1 y minK (SQTl1 y SQTl5, respectivamente) y se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales resultantes (Chouabe y cols., 1997; Schulze-Bahr y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003). De todas ellas, las mutaciones en la subunidad Kv7.1 son responsables de alrededor del 50% de los casos de SQTl (Roberts, 2006). Además, se ha descrito una mutación en el gen que codifica la proteína yotiao (proteína de anclaje para la PKA, AKAP, *A-Kinase Anchoring Protein*) que también cursa con prolongación del intervalo QT (SQTl tipo 11) (Chen y cols., 2007). La regulación  $\beta$ -adrenérgica de la  $I_{Ks}$  requiere el ensablaje de la proteína yotiao con la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (Marx y cols., 2002).

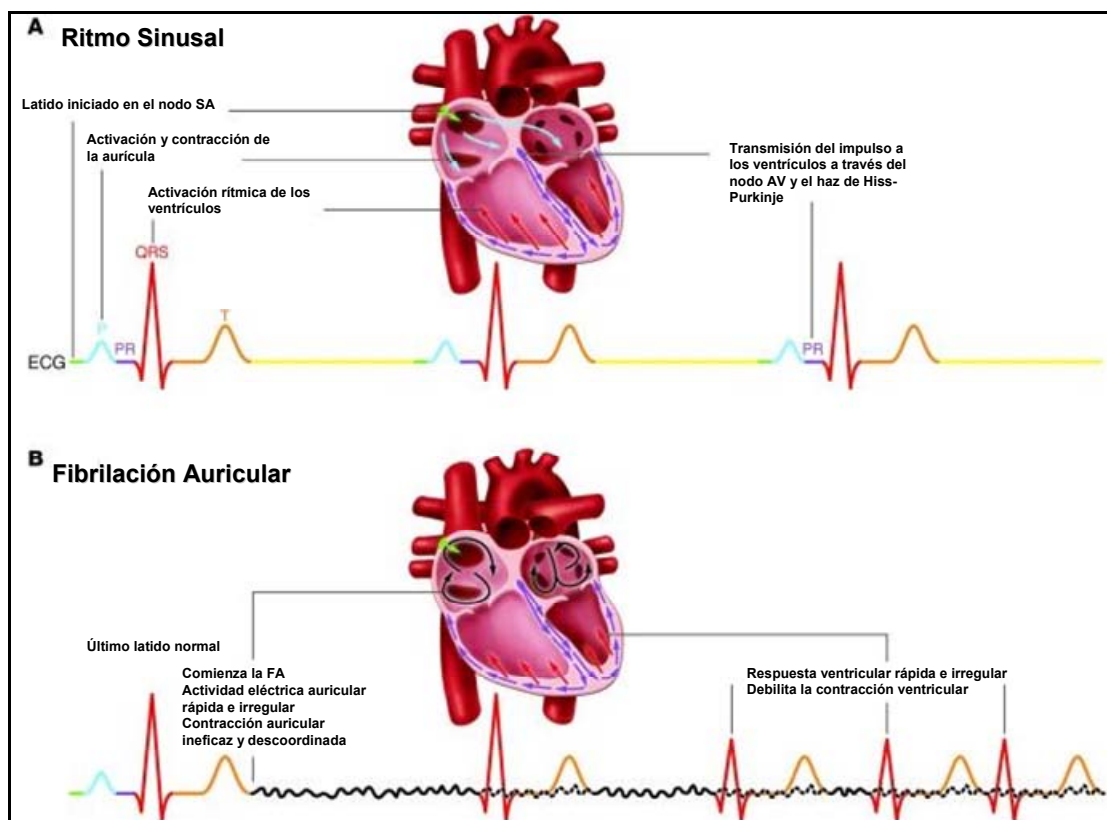
Existen además otras mutaciones en los genes KCNQ1 y KCNE1 relacionadas con la aparición del SJLN (síndrome de Jervell y Lange-Nielsen), variante autosómica recesiva del SQTl, que se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales que se forman (Chouabe y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

Por otra parte, se ha descrito una mutación en la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (Val307Leu) que produce una ganancia de función del canal y que está relacionada con la aparición de SQTc tipo 2 (Bellocq y cols., 2004) y mutaciones en Kv7.1 (Chen y cols., 2003b) y minK (Yang y cols., 2004) que se caracterizan también por producir una ganancia de función de los canales que generan y que se han asociado con la aparición de FA familiar.

### **3. FIBRILACIÓN AURICULAR**

La FA es una taquiarritmia supraventricular caracterizada por una activación descoordinada y muy rápida (>350 latidos por minuto) (Nattel, 2002; Fuster y cols., 2006). La FA presenta las siguientes características electrocardiográficas: a) intervalos RR totalmente irregulares, b) no se distinguen las ondas P en el ECG, aunque se puede apreciar algún tipo de

actividad eléctrica auricular normal en algunas derivaciones, especialmente en la V1, y c) el intervalo entre dos activaciones auriculares es generalmente variable e inferior a 200 ms. (Figura 32) (Camm y cols., 2010; Waikili y cols., 2011).



**Figura. 32. Registros electrocardiográficos de RS y FA. (A)** Esquema de los principales eventos ocurridos durante un ciclo de activación cardiaca: el impulso se inicia en el nodo SA, provocando la activación de la aurícula, seguido por la conducción atrioventricular vía nodo AV y sistema de His-Purkinje, para provocar la activación ventricular. En la zona inferior se muestra un ECG de RS. **(B)** ECG que muestra el inicio de FA tras un latido en RS. La activación auricular ahora es rápida e irregular, provocando una línea basal ondulante, visible si el intervalo QRS y la onda T no son demasiado grandes (la actividad auricular continuada se representa por la línea punteada). Durante la FA, la actividad auricular rápida y descoordinada provoca una contracción ineficaz de la aurícula (*Adaptada de Waikili y cols., 2011*).

La FA, según la *European Society of Cardiology* (ESC), el *American College of Cardiology* (ACC) y la *American Heart Association* (AHA), se clasifica en: a) FA de primer diagnóstico, cuando el paciente presenta FA por primera vez, sin tener en cuenta la duración de la arritmia ni la persistencia y severidad de los síntomas; b) FA paroxística, autolimitada generalmente a 48 h, aunque los episodios pueden durar hasta 7 días; c) FA persistente, si el episodio dura más de 7 días o si requiere cardioversión farmacológica o eléctrica para restaurar el RS; d) FA crónica, de larga duración (> 6 meses) y que no responde a cardioversión.

La FA es la arritmia cardiaca de mayor prevalencia en la población general (1-2%). El número de casos de FA aumenta con la edad, desde una prevalencia menor del 0.5% en pacientes de entre 40-50 años, a en torno a un 10 % en pacientes de 80 años y a más del 18% en pacientes mayores de 85 años (Fuster y cols., 2006; Camm y cols., 2010). Más de 6 millones de europeos padecen esta arritmia y debido al progresivo envejecimiento de la población, se estima que su prevalencia se duplicará en los próximos 50 años (Miyasaka y cols., 2006; Heeringa y cols., 2006; Camm y cols., 2010; Lip y cols., 2012).

La FA duplica la mortalidad del paciente independientemente de otros factores de riesgo diagnosticados (Stewart y cols., 2002). Además, provoca un aumento en el número de casos de infarto de miocardio (aproximadamente el 20% se deben a FA (Kirchof y cols., 2007)) y de eventos tromboembólicos, ya que favorece la aparición de trombos intra-auriculares hasta en un 26% de los pacientes (Wolf y cols., 1996), se diagnostica en un 15-35% de los pacientes con insuficiencia cardiaca (Maisel y Stevenson, 2003) y es la complicación postoperatoria más común tras cirugía cardiaca, llegando a diagnosticarse en un 30% de los pacientes sometidos a bypass coronario y en un 40% de las operaciones de válvula cardiaca (Crystal y cols., 2004). Además, aumenta el número de hospitalizaciones y disminuye la calidad de vida y la capacidad de esfuerzo (Thrall y cols., 2006).

### **3.1. Génesis de la FA**

A pesar del esfuerzo dedicado al estudio de la FA, todavía no se ha identificado un factor único que pueda considerarse *per se* la causa de la génesis y del mantenimiento de la FA. Clásicamente se distinguen dos mecanismos por los que se generan las taquiarritmias cardíacas: alteraciones en la secuencia de activación del miocardio (*reentrada*) y alteraciones en la iniciación del impulso (*origen focal*). En el caso de la FA, también se ha propuesto que el origen de la arritmia puede ser o bien la reentrada, o bien la presencia de focos que generan actividad a muy alta frecuencia. Los datos experimentales y clínicos demuestran que, en la mayor parte de los pacientes, la FA se produce la reentrada de uno o varios frentes de ondas de origen poco conocido.

En condiciones normales un impulso generado en el nodo sinusal muere tras la activación secuencial de aurículas y ventrículos, puesto que va quedando rodeado de tejido que acaba de excitar y que se encuentra, por tanto, en periodo refractario. Sin embargo, en condiciones

especiales, el impulso puede persistir y reexcitar dos o más veces el miocardio, originándose el fenómeno de *reentrada*.

La reentrada consiste en la perpetuación de un impulso en forma de frente de activación que gira constantemente en torno a un obstáculo inexcitable, definiendo con su trayectoria un circuito cerrado y activando el miocardio adyacente en cada giro. Para que se inicie esta recirculación es necesario que el impulso se bloquee en una dirección (*bloqueo unidireccional*), obligando al frente a invadir el circuito en el sentido contrario. El bloqueo se puede producir por la existencia de discontinuidades entre células (desacoplamiento celular o fibrosis), por discontinuidades macroscópicas del miocardio (debido a que éste se organiza en haces de fibras que convergen o divergen en distintos puntos), o por la presencia de obstáculos inexcitables que pueden ser anatómicos (las inserciones de las venas cavas o una escara quirúrgica o de un infarto previo) o funcionales (tejido excitable que en un momento dado no lo es) (Tamargo y Delpón, 2010).

El origen focal consiste en la aparición de un foco ectópico que genera actividad eléctrica automática que en el caso de la FA se localiza generalmente en la región de las venas pulmonares (VP), y que produce frentes de onda a elevadas frecuencias que se conducen al resto de la aurícula de forma fibrilatoria. Ambos mecanismos no son excluyentes entre sí y, de hecho, lo más probable es que puedan coexistir (Nattel, 2002; Fuster y cols., 2006; Kourliouros y cols., 2009).

### 3.1.1. Reentrada por múltiples ondas

En 1924 Garrey (Garrey, 1924) postuló la existencia teórica de circuitos de reentrada que no estuvieran determinados por la presencia de un obstáculo anatómico alrededor del cual girara el impulso. Más adelante, Gordon Moe propuso que la FA implicaba la activación continua de la aurícula por múltiples frentes de onda (*multiple wavelets theory*) de longitud y dirección variables. Según esta hipótesis, todo el miocardio auricular participaría en el mantenimiento de frentes de activación simultáneos que continuamente giran, se dividen, se fusionan o se extinguen. Los frentes de onda se fraccionarían en “ondas hijas” que se autoperpetuarían, propagándose por las aurículas (Moe y cols., 1964) (Figura 33A). Es decir, según esta hipótesis, la FA es el resultado de la activación caótica y desordenada del tejido auricular por múltiples frentes de reentrada.

El soporte experimental de esta hipótesis fue aportado por Allesie y cols., (Allesie y cols., 1985) que cartografiaron cómo la excitación se extendía por la aurícula durante la generación de una FA rápida en presencia de ACh, demostrando la existencia de múltiples ondas de propagación que provocaban una actividad auricular turbulenta. El frente de onda se establecería de tal forma que recorriese el mínimo trayecto para mantener la reentrada, generando un circuito al que denominó *leading circle*. Este modelo propuesto por Allesie, demostraba que eran necesarios entre 4 y 6 frentes de onda para mantener la FA. (Allesie y cols., 1985; Comtois y cols., 2005; Jalife, 2011). Un concepto importante para comprender la teoría de Allesie es el de *longitud de onda*, que se define como la distancia que recorre el impulso eléctrico durante un periodo refractario, siendo el producto del periodo refractario por la velocidad de conducción. Para que la activación auricular persista de forma continua, es decir, que el frente de onda reexcite el miocardio auricular, es necesario que el tiempo que el impulso tarda en recorrer el circuito sea superior al tiempo que el tejido tarda en recuperar su excitabilidad (es decir, superior al periodo refractario auricular). La coexistencia de periodos refractarios auriculares cortos y no uniformes y de una velocidad de conducción intra-auricular lenta, aumenta el número de circuitos de reentrada y facilita el automantenimiento de la FA.

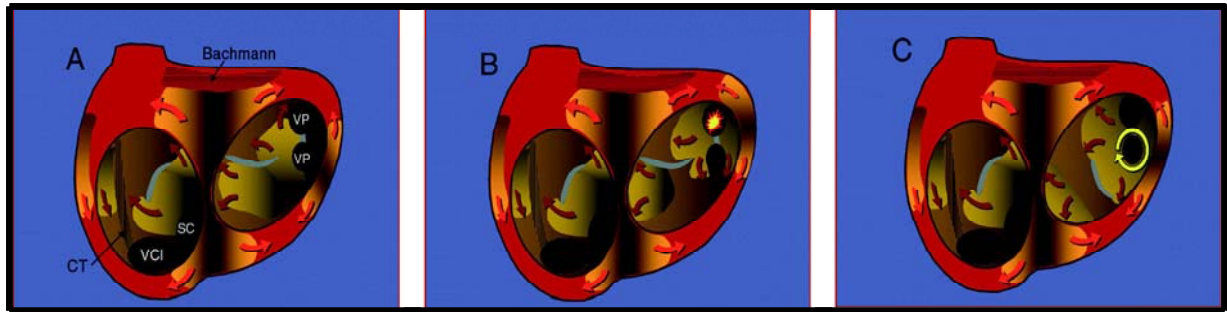
Más adelante, experimentos de registros simultáneos con múltiples electrodos demostraron la existencia de múltiples frentes de onda en pacientes con FA (Cox y cols., 1991). La teoría de los múltiples frentes de onda, sin embargo, no indica dónde ni cómo se generan los circuitos de reentrada. Durante muchos años, esta ha sido la teoría dominante en la explicación de la génesis de la FA, sin embargo, estudios cartográficos experimentales y clínicos pusieron en duda que este mecanismo fuera la única causa de FA (Mandapati y cols., 2000; Sanders y cols., 2005).

### 3.1.2. Origen focal de la FA.

A principios del siglo XX se postuló la idea de que la FA se producía por un foco ectópico cuya actividad se conducía al resto de la aurícula (Winterberg, 1907). En los años 20, David Scherf recuperó la teoría de la existencia de un foco automático para explicar la génesis de la FA. En sus experimentos aplicaba aconitina en el epicardio auricular induciendo FA, que podía parar enfriando la zona y reiniciar calentándola. Este hallazgo, unido a que la estimulación vagal aceleraba la frecuencia de la arritmia inducida por la aconitina, le llevó a



proponer la teoría del centro taquisistólico (“foco automático”) como mecanismo de generación de las arritmias cardíacas (Scherf, 1958) (Figura 33B). Sin embargo, dado que en los años 60 la teoría dominante era la de los múltiples frentes de reentrada, no se prestó más atención a la teoría focal hasta finales de siglo, cuando el Dr. Haïssaguerre describió casos de FA paroxística en pacientes debidos a descargas focales repetitivas desde las VP, que podían ser suprimidas mediante la ablación del foco de origen (Haïssaguerre y cols., 1998).



**Figura. 33. Representación esquemática de los mecanismos de génesis de FA.** La superficie endocárdica de las aurículas se representa a través de las válvulas mitral y tricúspide, mostrándose los orificios de la vena cava inferior (VCI), el seno coronario (SC) y las venas pulmonares izquierdas (VP). Las superficies de color anaranjado representan los frentes de activación y las flechas indican la dirección de propagación del frente, con un borde de avance claro y una estela de refractariedad oscura. Las zonas grises representan líneas de bloqueo funcional. Las zonas rayadas en negro representan haces anisotrópicos: la cresta terminal (CT) en la aurícula derecha y el haz de Bachmann en la izquierda. **A:** activación por múltiples ondas, sin un punto localizado de origen, que se mantiene por la propia dinámica de los frentes de activación. **B:** mecanismo focal en el que la activación irregular (fibrilatoria) tiene su origen en un foco automático de alta frecuencia (estrella amarilla) en una vena pulmonar. **C:** rotor anclado en torno a la VP inferior izquierda como motor de la activación, que también produce conducción fibrilatoria. (*Adaptada de García-Cosío, 2007*)

Los mecanismos responsables de la aparición de la actividad focal podrían ser diversos, entre los que cabe destacar:

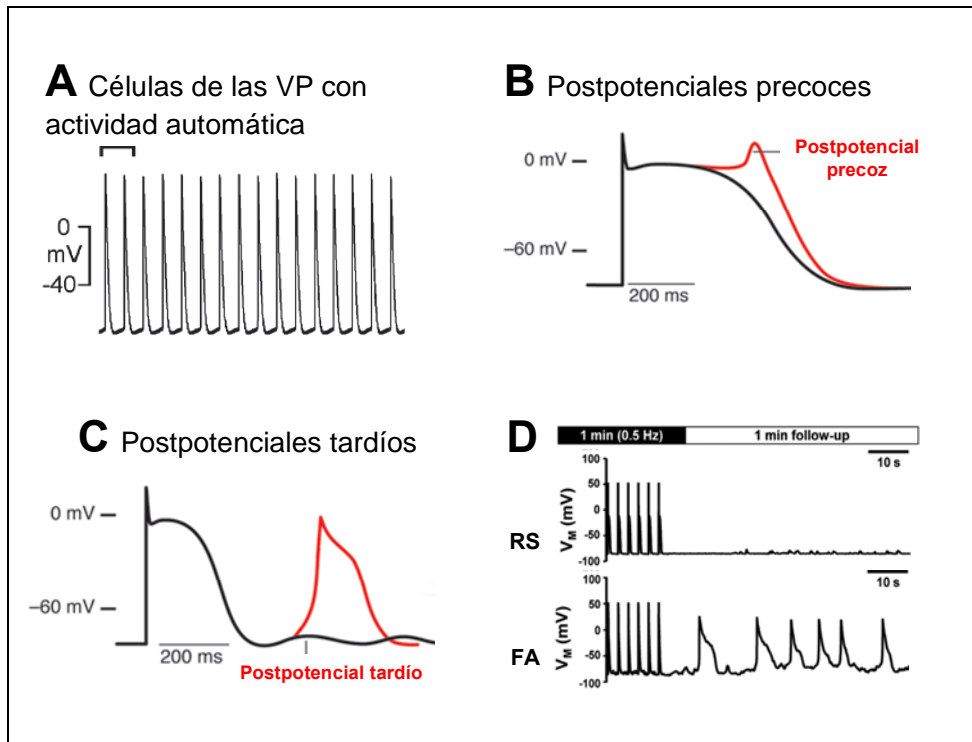
- Presencia de células de las VP con actividad automática: Las VP, especialmente en su porción más distal, en la zona en la que el vaso se une con el tejido de la AI, presentan células con menor  $I_{Ca}$  e  $I_{to}$ , pero con mayor corriente transitoria de entrada despolarizante ( $I_{Ti}$ ) y corriente marcapaso ( $I_f$ ), por lo que son capaces de desarrollar actividad automática a elevadas frecuencias (Cheung, 1981; Chen y cols., 2001) (Figura 34A). Aunque las VP son la fuente más frecuente de actividad focal ectópica, también se puede generar en otras localizaciones como la vena cava superior, el ligamento de Marshall, la pared libre posterior izquierda, la cresta terminal y el seno coronario (Haïssaguerre y cols., 1998; Chen y cols., 1999).
- Automatismo anormal: El automatismo anormal es el mecanismo por el que cualquier célula cardíaca que está parcialmente despolarizada ( $-60$  /  $-55$  mV), puede generar impulsos espontáneamente. La despolarización puede ser consecuencia de la isquemia, la

fibrosis, la hiperpotasemia o una miocardiopatía. La fase 0 de los PAs generados por automatismo anormal se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , puesto que a esos niveles de potencial de membrana los canales de  $\text{Na}^+$  se encuentran en estado inactivo. Esto explica por qué la aparición de automatismo anormal se ve favorecida en presencia de fármacos que aumentan la  $I_{\text{Ca}}$  (catecolaminas) y por qué los impulsos generados se conducen lentamente.

- Actividad desencadenada: se denomina así a las oscilaciones del potencial de membrana, denominadas *postpotenciales precoces*, si ocurren durante la repolarización (fases 2 y 3 del PA) (Figura 34B) o *postpotenciales tardíos*, si tienen lugar durante la fase 4 del PA, una vez completada totalmente la repolarización (Figura 34C) (Wakili y cols., 2011). Si estas despolarizaciones alcanzan el potencial umbral podrán generar PA (actividad desencadenada) muy prematuros, que pueden iniciar frentes de activación.

La aparición de focos ectópicos generados por postpotenciales precoces está favorecida por situaciones que prolongan la fase de meseta del PA. Se han identificado mutaciones que producen la pérdida de función de canales de  $\text{K}^+$  que participan en la repolarización, como Kv1.5 (Olson y cols., 2006), Kv7.1 y minK (Ehrlich et al., 2005; Bartos et al., 2001; Girmatsion et al., 2011) en pacientes afectados por formas hereditarias de FA. Se ha propuesto que en estos pacientes la marcada prolongación de la DPA auricular promovería la aparición de postpotenciales precoces que, a su vez, generarían PA a altas frecuencias que desencadenarían la FA.

La aparición de postpotenciales tardíos se ve favorecida en condiciones de sobrecarga de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  o que potencian la activación del intercambiador NCX. La  $[\text{Ca}^{2+} \text{ libre}]_i$  aumenta marcadamente durante la contracción cardíaca, mientras que disminuye durante la relajación diastólica, porque parte del  $\text{Ca}^{2+}$  es introducido en el retículo sarcoplásmico, mientras que otra parte es extraída por el intercambiador NCX. Este transportador es electrogénico, ya que introduce 3 iones  $\text{Na}^+$  por cada ión  $\text{Ca}^{2+}$  que extrae, generando  $I_{\text{Ti}}$ , que podría iniciar el postpotencial tardío (Nattel, 2002; Waikili y cols., 2011). El remodelado auricular que sufren los pacientes con FA da lugar a alteraciones en el manejo del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (principalmente un aumento en la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico y un aumento en la actividad del intercambiador NCX) que favorecen la aparición de postpotenciales tardíos (Ver apartado 3.3.1) (Figura 34D) (Voigt y cols., 2012).



**Figura 34. Mecanismos de actividad focal ectópica.** A: Registros de PA en las VP de conejo. B: Postpotenciales precoces. Despolarizaciones anormales de la membrana durante la fase de repolarización. C: Postpotenciales tardíos. Despolarizaciones anormales de la membrana tras la repolarización. D: Registros de las oscilaciones del potencial de membrana en miocitos de un paciente en RS (arriba) y de un paciente con FA crónica (abajo) tras estimulación durante 1 minuto a 0.5 Hz. Como se puede observar, los registros en miocitos de pacientes con FA muestran postpotenciales tardíos [Adaptadas de Chang y cols., 2012 (A); Wakili y cols., 2011 (B y C); Voigt y cols., 2012 (D)].

Los frentes de excitación generados por cualquiera de los mecanismos descritos, se generan a frecuencias muy elevadas (15-20 Hz), por lo que no se conducen en la aurícula de forma continua, sino que se produce conducción “fibrilatoria”, desorganizándose la activación tanto más, cuanto más se aleja del foco que la genera.

- Frentes de onda espirales o rotores. Se ha demostrado que los frentes que invaden el miocardio cuando la excitabilidad disminuye en un punto no son lineales, sino curvos. Se denomina *rotor* a la reentrada generada por frentes curvos que gira en torno a un eje vertical imaginario denominado *pivote* a gran velocidad. Los rotores generan frentes de excitación a frecuencias muy altas (>10 Hz) que invaden el resto de la aurícula de forma desorganizada y que presentan conducción fibrilatoria.

La teoría de los rotores nace de la observación de reacciones químicas en medios excitables, y está muy influenciada por hallazgos obtenidos en experimentos de imagen de flujos de  $[Ca^{2+}]_i$  en oocitos de *Xenopus* y por el resultado de simulaciones en modelos matemáticos (Schotten y cols., 2011). El músculo cardíaco es un medio excitable y como tal, comparte muchas de las características observadas en este tipo de medios, en cuanto a

la propagación de ondas espirales. Al mismo tiempo que Allesie desarrollaba su concepto del *leading circle*, se desarrollaron experimentos químicos y modelos matemáticos que predecían que el corazón podría tener actividad eléctrica que rotase alrededor de un obstáculo funcional (Jalife, 2011). Aunque no universalmente aceptada, la teoría de los rotores se ha convertido en una importante explicación mecanística de la FA (Voigt y cols., 2010; Skanes, 2009; Narayan y cols., 2012).

La velocidad de conducción de un frente de excitación en el miocardio depende de la relación entre la intensidad de la corriente despolarizante proporcionada por las células excitadas (*source*) y la corriente necesaria para la excitación de las células en reposo que el frente encuentra en su avance (*sink*) (*source/sink ratio*). Haciendo una aproximación simplificada, en el caso de un frente lineal, cada célula excitada es responsable de la despolarización de “una única célula” por lo que este balance es equilibrado y la velocidad de conducción del frente es única y estable. Por el contrario, en el caso de un frente espiral, la curvatura del frente implica que el número de células en reposo que debe ser despolarizado por cada célula excitada aumenta, de modo que la carga de la célula excitada debe repartirse entre varias células para que el frente pueda avanzar. Esto implica que la velocidad de conducción disminuye y lo hará tanto más cuanto mayor sea la curvatura del frente. Por tanto, la velocidad de conducción de un frente espiral no es única, sino que disminuye progresivamente a medida que la curvatura del frente aumenta y nos acercamos al pivote del rotor. De hecho, el pivote del rotor se mantiene en reposo a pesar de que el tejido sea excitable (Fast y Kleber, 1997; Comtois y cols., 2005; Schotten y cols., 2011). Además, el pivote del rotor tiene un poderoso efecto electrotónico, por lo que tiende a provocar un acortamiento de la DPA a sus alrededores, lo que, junto con la baja velocidad de conducción, explica la corta longitud de onda en sus proximidades (Schotten y cols., 2011; Jalife 2011).

En consecuencia, un frente de onda espiral no se puede definir por una única longitud de onda, puesto que la velocidad de conducción y el periodo refractario no son iguales a lo largo de todo el frente, sino que aumentan continuamente desde el eje hasta la periferia (Beaumont y cols., 1998; Jalife, 2011).

### 3.1.3. Localización de los focos de FA

Recientemente se ha publicado el primer estudio de mapeo espaciotemporal de la dinámica de la FA en 49 pacientes que iban a ser sometidos a ablación (Narayan y cols., 2012). Cuarenta y siete de los 49 pacientes presentaban rotores estables, y once de los 49 mostraban además focos automáticos que provocaban conducción fibrilatoria a su alrededor. Las tres cuartas partes de las fuentes fibrilatorias se localizaban en la AI. Este resultado concuerda con los datos experimentales obtenidos mediante análisis espectral de alta resolución, que muestran que la pared posterior de la AI es la que alberga las fuentes con actividad espaciotemporalmente organizada más rápida. (Mandapati y cols., 2000; Kalifa y cols., 2006). Los frentes de onda generados por estas fuentes adquieren patrones de conducción espacialmente complejos a medida que se acercan a la AD, y en conjunto, se manifiestan como un patrón de conducción fibrilatoria (Berenfeld y cols., 2002). Por tanto, el avance tecnológico ha permitido demostrar que en algunos tipos de FA existe un patrón organizado en la actividad eléctrica auricular que no concuerda con la activación caótica propuesta por la teoría de los múltiples frentes de onda.

Diversos estudios en modelos animales de FA paroxística y crónica sugieren que la AI es la aurícula principalmente implicada en el mantenimiento de la FA. Dos estudios en un modelo bovino de FA crónica (Mansour y cols., 2001; Skanes y cols., 1999) demostraron que las frecuencias más rápidas ocurrían en la pared posterior de la AI y que existía un gradiente de frecuencia AI-AD. En un modelo canino de FA paroxística (Morillo y cols., 1999), se describía que las frecuencias eran más rápidas en la AI que en la AD. Otro grupo de investigación que utilizaba este mismo modelo (Sih y cols., 2000), describió que en la FA crónica el gradiente de frecuencias AI-AD se mantenía y que las frecuencias eran más rápidas en ambas aurículas en el modelo de FA crónica que en el de FA paroxística. Un estudio en pacientes que iban a ser sometidos a ablación quirúrgica de las VP llevado a cabo por el grupo de Lazar y cols. (Lazar y cols., 2004) obtuvo las siguientes conclusiones: 1) que existe un gradiente de frecuencias AI-AD, en consonancia con los resultados en modelos experimentales y 2) que este gradiente desaparecía cuando la FA se mantenía durante más de un mes, lo que se atribuía a un aumento de la frecuencia de la AD hasta hacerse similar a la de la AI.

El soporte experimental a la idea de que la mayoría de las fuentes de FA se localiza en la AI viene de estudios en pacientes que demuestran que el aislamiento mediante ablación de las

VP es una estrategia efectiva para parar la FA paroxística (Medi y cols., 2011). Sin embargo, es importante tener en cuenta que en un gran porcentaje de los pacientes, mantener el RS a largo plazo requiere repetir el proceso de ablación de los focos o administrar tratamiento crónico con antiarrítmicos, demostrando que los focos generados en la zona de las VP no son los únicos responsables del mantenimiento de la FA. Es razonable especular que el tejido auricular, al estar sometido de forma continua a altas frecuencias y al ser bombardeado de forma heterogénea con ondas fibrilatorias durante la FA, sufra un proceso de remodelado eléctrico suficiente para la aparición de nuevas fuentes y rotores en ambas aurículas, fuera de la zona de las VP (Sanders y cols., 2005). Aunque esta idea aun está por confirmar, también explicaría el bajo índice de éxito en evitar la aparición de rotores secundarios en la AD tras ablación de las fuentes primarias en la AI (Jalife, 2011).

La razón por la cual la AI alberga las fuentes con mayores frecuencias todavía no se comprende del todo. Probablemente la causa sea multifactorial, por lo que es necesario el estudio de las propiedades específicas de la AI. Estas propiedades pueden resumirse en: a) la AI está expuesta a una mayor presión intracavitaria y por lo tanto sus paredes y músculos son más gruesos y heterogéneos que los de la AD; b) Las VP están localizadas en la AI; c) los bordes del fascículo septopulmonar de la pared posterior de la AI forman una barrera tridimensional efectiva que dificulta la propagación de los impulsos eléctricos prematuros generados en las VP (Hocini y cols., 2010). A medida que se desplazan por la aurícula, algunas de estas ondas pueden romperse, iniciando el proceso de reentrada; d) la rica inervación de la pared posterior de la AI, ya que en muchos pacientes, los paroxismos de FA son iniciados por descargas simpáticas o vagales (Sarmast y cols., 2003; Shen y cols., 2012); e) los procesos de dilatación y estiramiento establecen las condiciones para la formación de los rotores primarios en la pared posterior de la AI (Kalifa y cols., 2003; Yamazaki y cols., 2009); f) la edad, la disfunción diastólica, el remodelado eléctrico y la fibrosis establecen el sustrato ideal para la FA (Swartz y cols., 2009; Lubitz y cols., 2010; Savelieva y cols., 2010). Todos estos procesos tienden a ser más marcados en la AI que en la AD (Swartz y cols., 2009).

Sin embargo, no existían apenas datos en cuanto a las posibles diferencias en las propiedades electrofisiológicas entre los miocitos de ambas aurículas que pudieran explicar por qué las fuentes de origen de la FA y la mayor frecuencia de la actividad aparecen en la AI. Hasta la fecha, la mayor parte de los datos en lo que respecta a las diferencias en las características eléctricas entre ambas aurículas proviene de estudios con animales de

experimentación. Un estudio en un modelo de ratón (Nygren y cols., 2004) determinó que la DPA era más corta en los miocitos de la AI que en los de la AD. Otro estudio en perros (Li y cols., 2001) demostró una mayor densidad de  $I_{Kr}$  en los miocitos de la AI que en los de la AD y no encontró diferencias significativas en ninguna de las demás corrientes estudiadas. En otro estudio en ratón (Lomax y cols., 2003) se comparaban las corrientes tiempo- y voltaje-dependientes de  $K^+$  de ambas aurículas, siendo mayores en la AI que en la AD, lo que justificaba que la DPA registrada fuera significativamente más corta en los miocitos de la AI que en los de la AD.

En lo que respecta a los humanos, un estudio que comparaba la  $I_{K1}$  de la AD y la AI de pacientes con FA paroxística y en RS (Voigt y cols., 2010), concluyó que existe un gradiente AI-AD de densidad de  $I_{K1}$  que probablemente contribuye a la existencia de focos de actividad a altas frecuencias en la AI de los pacientes con FA paroxística, ya que un aumento en la densidad de la  $I_{K1}$  abrevia la DPA e hiperpolariza los miocitos auriculares, aumentando la disponibilidad de canales de  $Na^+$ , lo que facilita la estabilización y la aceleración de los rotores que mantienen la FA.

A la vista de la falta de datos, parece necesaria la investigación de las características electrofisiológicas que diferencian la AI de la AD en el hombre, lo que permitirá una mejor comprensión de los mecanismos de génesis y mantenimiento de la FA, y por ende, una mejora en la terapéutica de la misma.

### **3.2. Causas y condiciones asociadas a la FA**

La FA se asocia a una gran variedad de enfermedades cardiovasculares y condiciones clínicas que promueven la aparición y la perpetuación de la FA, así como con varias causas.

- Causas reversibles de FA. La FA puede ser un proceso temporal asociado a la ingesta de alcohol, la cirugía cardíaca/coronaria, la electrocución, el infarto de miocardio, la pericarditis, la miocarditis, el embolismo pulmonar y otras enfermedades pulmonares, el hipertiroidismo y otros desórdenes metabólicos. Por lo general, en estos casos, el tratamiento de la causa termina con el episodio de FA. (Fuster y cols., 2006; Camm y cols., 2010)
- FA sin enfermedad cardiovascular asociada. Aproximadamente el 30-45% de los casos de FA paroxística y el 20-25% de los casos de FA permanente ocurren en pacientes jóvenes sin ninguna enfermedad cardiovascular previa (Levy y cols., 1999). Por otra parte, la

edad aumenta el riesgo de desarrollar FA, posiblemente debido al envejecimiento del tejido miocárdico y a los trastornos en la conducción derivados del mismo (Camm y cols., 2010).

- FA asociada a enfermedad cardiovascular. Las enfermedades cardiovasculares que más comúnmente se asocian a FA incluyen las valvulopatías (especialmente la valvulopatía mitral), la insuficiencia cardíaca (clases II-IV según la clasificación de la *New York Heart Association* [NYHA]), la cardiopatía isquémica, la enfermedad coronaria y la hipertensión, en particular si va asociada a hipertrofia del ventrículo izquierdo (VI). Además, la FA también puede asociarse a la miocardiopatía hipertrófica, la cardiomiopatía dilatada y las cardiopatías congénitas, especialmente en patologías de la comunicación interauricular (Fuster y cols., 2006; Camm y cols., 2010).
- Obesidad. Es un importante factor de riesgo independiente para el desarrollo de FA (Frost y cols., 2005), relacionado con la dilatación de la AI. Su tamaño aumenta gradualmente cuando el índice de masa corporal (IMC) pasa de ser normal a indicar sobrepeso y obesidad. Una AI dilatada es el sustrato ideal para el mantenimiento de la FA. En el estudio *Europace*, un 25% de los sujetos con FA, tenían un IMC >27.5 (indicador de obesidad moderada) (Näbauer y cols., 2009).
- FA familiar o genética. La FA familiar es más común de lo que previamente llegó a pensarse, aunque debe ser diferenciada de la FA secundaria a cardiomiopatías hereditarias. Hasta el momento, se han descrito formas de FA asociadas con mutaciones en el gen que codifica el péptido natriurético auricular (Hodgson-Zingman y cols., 2008), mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica la subunidad  $\alpha$  del canal de  $\text{Na}^+$  (SCN5A), o de ganancia de función en el gen KCNQ1, que codifica la subunidad  $\alpha$  del canal de  $\text{K}^+$  Kv7.1 y en el gen que codifica su subunidad accesoria (MiRP1), provocando un aumento de la  $I_{\text{Ks}}$  (Chen y cols., 2003; Yang y cols., 2004) y una mutación de ganancia de función en el gen KCNJ2, que codifica el canal de  $\text{K}^+$  Kir2.1 (Xia y cols., 2005).
- Influencia del sistema nervioso autónomo. El equilibrio entre las influencias simpáticas y vagales es un importante predictor de FA. Descargas simultáneas simpático-vagales contribuyen al desarrollo y mantenimiento de arritmias auriculares, ya que aumentan tanto la  $I_{\text{Ca,L}}$  como la liberación espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico, acortando la DPA (Shen y cols., 2012). Aunque algunos pacientes presentan un predominio del tono vagal minutos antes de la aparición de un episodio de FA y otros, predominio del tono simpático, estos casos representan los extremos de ambas influencias. La FA por mediación vagal suele ocurrir por la noche o después de las comidas, mientras que la FA de tipo



adrenérgico, ocurre típicamente por el día (Maisel, 2003). Se están desarrollando nuevas estrategias que incluyen la ablación y la estimulación ganglionar que podrían reducir la actividad nerviosa arritmogénica, pero es necesario un mayor conocimiento de las mismas para poder ser aplicadas a nivel clínico (Shen y cols., 2012).

### **3.3. Remodelado en la FA**

La FA provoca una alteración de las propiedades auriculares, tanto a nivel electrofisiológico como a nivel estructural, promoviendo su propio mantenimiento y recurrencia, ya que hace que la aurícula se convierta en el sustrato idóneo para la perpetuación de la arritmia. Así pues, se puede decir que la FA promueve la FA (*AF begets AF*) (Wijffels y cols., 1995; Nattel y cols., 2000; Workman y cols., 2001; Krogh-Madsen y cols., 2012). Esta adaptación fisiopatológica de las aurículas al ritmo fibrilatorio se denomina *remodelado auricular*. Más específicamente, los cambios que afectan a la excitabilidad y a la actividad eléctrica de los miocitos auriculares se denominan *remodelado eléctrico* y los cambios en el tamaño de la cámara, depósito de colágeno y estructura en general, *remodelado estructural* (Van Wagoner y Nerbonne, 2000).

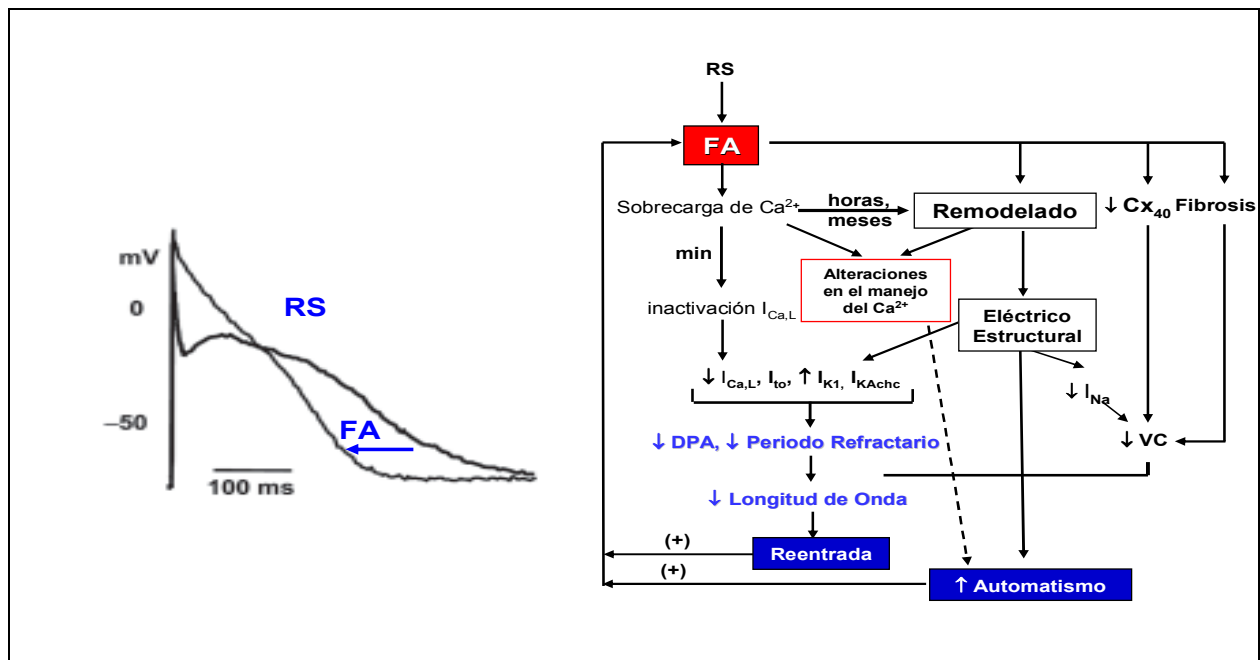
#### **3.3.1 Remodelado eléctrico**

Este concepto se refiere a los cambios en las propiedades eléctricas de la aurícula producidos por la FA y que promueven la aparición de FA. Fundamentalmente consiste en el acortamiento de la DPA y por ende, del periodo refractario, a todas las frecuencias de estimulación, favoreciendo que un mayor número de frentes de onda de excitación convivan simultánea y desordenadamente en la aurícula (Wijffels y cols., 1995; Nattel y cols., 2000; Tamargo y cols., 2004a; Dobrev, 2006; Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011).

El acortamiento de la DPA y del periodo refractario ocurre minutos después del inicio de la FA. El remodelado eléctrico también suprime la adaptación de la DPA a la frecuencia cardiaca, que es un mecanismo de protección frente a la aparición de arritmias (Wijffels y cols., 1995). Finalmente, tras varias semanas de FA, se produce una disminución de la velocidad de conducción intra-auricular, que a su vez contribuye a la progresión del remodelado eléctrico y a la perpetuación de la arritmia (Allessie y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004a).

El remodelado eléctrico es debido a cambios en la expresión y en las propiedades de los canales iónicos responsables de las corrientes que generan el PA auricular (Van Wagoner y cols., 1999; Nattel y cols., 2000; Gaborit y cols., 2005; Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011; Michael y cols., 2009).

Se ha descrito que la FA produce una disminución no significativa de la  $I_{Na}$  ( $\approx 10\%$ ), y un desplazamiento de la curva de inactivación hacia potenciales más positivos, lo que demuestra que la FA produce alteraciones en las propiedades biofísicas de los canales de  $Na^+$  (Bosch y cols., 1999). La expresión de la subunidad  $\alpha$  de los canales de  $Na^+$  no se ve modificada por la presencia de FA (Brundel y cols., 2001). Por el contrario, la densidad de la  $I_{Ca,L}$  se reduce un 70% en los pacientes con FA (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999; Skasa y cols., 2001; Schotten y cols., 2011), como consecuencia de una disminución en la expresión del ARNm y de los niveles de Cav1.2, la subunidad  $\alpha$  del canal de  $Ca^{2+}$  tipo L (Brundel y cols., 2001; Gaborit y cols., 2005; Schotten y cols., 2011). La disminución de la  $I_{Ca,L}$  es un mecanismo compensatorio que trata de reducir la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  que produce la elevada frecuencia cardiaca propia de la FA, y ocurre de forma inmediata (Figura 35).



**Figura 35. Hipótesis de la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  en el remodelado eléctrico de la FA.** Los miocitos se adaptan a la taquicardia auricular disminuyendo la carga de  $Ca^{2+}$ . Esto ocurre mediante la reducción de la  $I_{Ca,L}$ , y todas las modificaciones en las corrientes de potasio que conforman el remodelado eléctrico y estructural (fibrosis y alteración de conexinas [Cx]) pero a expensas del acortamiento en la DPA y por lo tanto, de una mayor susceptibilidad a la recurrencia y perpetuación de la FA. (Adaptada de Dobrev, 2006).

El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a un sitio de alta afinidad en el canal provocando una inactivación del canal  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente (Michael y cols., 2009). Se ha descrito que este aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , además activa y aumenta la expresión de la calpaína, enzima proteolítica que probablemente sea la responsable de la disminución en los niveles de Cav1.2 (Goette y cols., 2002; Brundel y cols., 2002). También se han descrito varios mecanismos subcelulares por los cuales la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y la reducción de la  $I_{\text{Ca,L}}$  podrían mediar el remodelado auricular, incluyendo la activación de kinasas o fosfatasa  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes, además de mecanismos inflamatorios asociados con un aumento del estrés oxidativo (Michael y cols., 2009). El manejo del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  también se encuentra alterado en los miocitos de pacientes con FA (Liang y cols., 2008; Neef y cols., 2010; Wakili y cols., 2011). El retículo sarcoplásmico es la principal organela en la que se acumula el ión. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al miocito durante la fase de meseta del PA provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico a través del RyR2. Esta liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la sístole es la responsable de la contracción cardíaca. Tras la repolarización, la relajación cardíaca diastólica ocurre cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  es retirado de vuelta al retículo sarcoplásmico mediante una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA). Posteriormente, el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico se extrae del citosol mediante el intercambiador NCX. Los estudios en tejido auricular de pacientes con FA muestran un manejo alterado del  $\text{Ca}^{2+}$ , que provoca liberaciones espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico durante la diástole. Sin embargo, la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del retículo sarcoplásmico no se encuentra modificada, sugiriendo que las descargas espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$  son debidas a alteraciones en la función del RyR2. En particular, la FA promueve la fosforilación de las Ser2808 y 2814 del RyR2 por parte de la PKA y la CaMKII, respectivamente (Neef y cols., 2010). La fosforilación del RyR2 aumenta, a su vez, su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando su probabilidad de apertura. La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  también induce un mal funcionamiento del RyR2 vía hiperfosforilación de fosfolambano, un inhibidor de la SERCA que al hiperfosforilarse pierde su capacidad inhibitoria, promoviendo una mayor recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplásmico.

Estos hallazgos sugieren que el desarrollo de tratamientos cuya diana sean las disfunciones del retículo sarcoplásmico auricular (como por ejemplo, la inhibición de la de la CaMKII, el bloqueo de los canales RyR2 o la manipulación del transporte de iones mediado por el intercambiador NCX), podría ofrecer posibilidades terapéuticas para la FA.

El potencial terapéutico de los inhibidores de cinasas ha sido ampliamente cuestionado, debido a que la secuencia de las cinasas está altamente conservada y a la ubicuidad de estas

enzimas. Esto hace que el diseño de fármacos específicos y tejido-selectivos sea prácticamente imposible por el momento.

Por otra parte, el bloqueo directo del RyR2 también podría regular la liberación espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico. Se ha descrito que la tetracaína (un anestésico local) aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para que se inicien las descargas espontáneas a través del RyR2, reduciendo esta vía de liberación anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Venetucci y cols., 2006). También se ha descrito que la flecainida (antiarrítmico de clase I) disminuye la probabilidad de apertura del RyR2 (Hilliard y cols., 2010). Sin embargo, el principal mecanismo de acción de ambos fármacos es el bloqueo de canales de  $\text{Na}^+$ , lo que puede provocar arritmias ventriculares, especialmente en pacientes con enfermedad coronaria. El desarrollo de fármacos similares que no tengan efectos sobre los canales de  $\text{Na}^+$ , podría ser una terapia eficaz en el tratamiento de la FA (Dobrev y Wehrens, 2010).

Por último, otra aproximación terapéutica para mejorar la disfunción del retículo sarcoplásmico podría consistir en un bloqueo del intercambiador NCX sólo en la dirección en la que extrae el  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto evitaría la generación de  $I_{\text{TI}}$  y prevendría la aparición de postpotenciales tardíos. Sin embargo, aunque existen algunos inhibidores del NCX en desarrollo, tienen escasa selectividad y bloquean distintos canales y transportadores, lo que limita su potencial terapéutico (Dobrev y Wehrens, 2010).

Por lo que respecta a las corrientes de salida de  $\text{K}^+$ , la FA produce una marcada disminución de la  $I_{\text{to}}$ , atribuida a una disminución del nivel de ARNm y de la expresión de la proteína Kv4.3 (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999; Brundel y cols., 2001; Workman y cols., 2001; Michael y cols., 2009; Nattel y cols., 2010). En cuanto a la  $I_{\text{Kur}}$ , se ha descrito que, aunque los niveles de ARNm de Kv1.5 no se modifican, la cantidad de proteína se reduce en pacientes con FA debido a un proceso proteolítico, haciendo que la  $I_{\text{Kur}}$  también se vea disminuida (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999; Brundel y cols., 2001; Christ y cols., 2008). La disminución de estas dos corrientes repolarizantes fue una sorpresa, ya que una menor salida de  $\text{K}^+$  tendría como efecto una prolongación de la DPA y del periodo refractario. Se ha propuesto que la disminución de estas corrientes podría ser un mecanismo de defensa celular en un intento de contrarrestar el acortamiento de la DPA provocado por la disminución de la  $I_{\text{Ca,L}}$ . En relación a las corrientes de  $\text{K}^+$  con rectificación tardía, los datos son bastante limitados, probablemente debido a la gran dificultad técnica que conlleva registrarlas en miocitos humanos aislados. Según los datos disponibles, la FA no altera la  $I_{\text{Kr}}$  (Bosch y cols., 1999). Por lo que respecta a la  $I_{\text{Ks}}$  se han descrito tanto un aumento como una

disminución en la expresión de las proteínas Kv7.1 y de minK (Bosch y cols., 1999; Lai y cols., 1999; Gaborit y cols., 2005; Michael y cols., 2009), subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente, que forman los canales que generan esta corriente. Sin embargo, hasta la fecha, la  $I_{Ks}$  no se había registrado ni se habían comparado sus propiedades en miocitos de pacientes con y sin FA.

La FA produce alteraciones en las corrientes de  $K^+$  con rectificación interna y éstas tienen un importante papel en los cambios en la repolarización y en la arritmogénesis. La  $I_{K1}$  se encuentra aumentada en pacientes con FA, debido a un marcado aumento en la expresión de los canales Kir 2.1, responsables de la generación de esta corriente y a un aumento en la probabilidad de apertura del canal, que podría explicarse por alteraciones en el grado de desfosforilación del canal (Michael y cols., 2009; Bosch y cols., 2009; Workman y cols., 2001; Dobrev y cols., 2001; Gaborit y cols., 2005; Voigt y cols., 2010). Por otra parte, se ha descrito que la FA promueve la activación constitutiva de la  $I_{KACh}$ , a pesar de que se observa una disminución tanto del ARNm como de las proteínas Kir3.1 y 3.4, formadoras de los canales responsables de esta corriente (Brundel y cols., 2001). Esta activación constitutiva es debida a una fosforilación anormal del canal mediada por PKC (Cha y cols., 2006; Dobrev y cols., 2005; Schotten y cols., 2011).

Además, se ha observado un aumento del ARNm del canal que genera la  $I_f$  (Lai y cols., 1999). En miocitos aislados de VP de perros sometidos a frecuencias de estimulación auriculares de 780 latidos por minuto durante 6-8 semanas, se observó mostraban un marcado aumento en la densidad de la  $I_f$  (Chen y cols., 2001). Por el momento, no se ha descrito en humanos si el remodelado eléctrico producido por la FA produce modificaciones en la amplitud de esta corriente o en la expresión de los canales HCN que la generan, pero un aumento de la misma podría contribuir a la actividad ectópica auricular (Dobrev y Ravens, 2003).

### 3.3.2. Remodelado estructural

La FA produce alteraciones progresivas de la estructura del tejido auricular, convirtiéndolo en el sustrato perfecto para su perpetuación. Estas alteraciones se manifiestan como dilatación, que aumenta el tamaño de la cámara y como fibrosis, que disminuye la velocidad de conducción del impulso eléctrico (Henry y cols., 1976; Ausma y cols., 1997; Allesie y cols., 2001). En modelos experimentales de FA, este remodelado tiene una

naturaleza predominantemente adaptativa, sugiriendo un mecanismo de protección por parte del miocito frente al estrés ambiental.

En 1976 ya se describió que los pacientes con FA presentaban un aumento del tamaño de la AI (Henry y cols., 1976). A continuación, en 1977, se publicó uno de los primeros estudios en el que se describían las alteraciones histológicas asociadas a la FA (Thiedemann y Ferrans, 1977). La evaluación microscópica del tejido auricular de pacientes con valvulopatía mitral mostraba grados variables de fibrosis, un importante número de células hipertrofiadas y otras que habían sufrido miolisis. Sus núcleos habían cambiado de forma y tamaño y, ocasionalmente, se observaban células con más de un núcleo. Se descubrió que más del 90% de estos pacientes con alteraciones estructurales severas padecían FA. Más adelante, el grupo de la Dra. Boyden describió los cambios histológicos que sufrían las aurículas dilatadas de perros con fibrosis de válvula mitral. En este modelo, el volumen de la aurícula era hasta seis veces mayor de lo normal y la mayoría de los animales sufrían arritmias auriculares. Además, se observaba un aumento drástico del grado de fibrosis intersticial (Boyden y cols., 1982). Mary-Rabine y cols. relacionaron la presencia de FA y de dilatación auricular con el grado de anormalidades histológicas como hipertrofia y miolisis (Mary-Rabine y cols., 1983). Mas recientemente, se ha demostrado que a nivel tisular, el remodelado estructural se caracteriza por una pérdida de miocitos y por cambios en la composición de la matriz extracelular, con fibrosis tanto difusa como en forma de parches (Aldhoon y cols., 2010).

A nivel celular, los cambios estructurales producidos por la FA incluyen: (1) aumento del tamaño celular, (2) acumulación perinuclear de glucógeno, (3) pérdida central de los sarcómeros o miolisis, (4) alteraciones en la expresión de conexinas, (5) cambios en la morfología de las mitocondrias, (6) fragmentación del retículo sarcoplásmico, (7) distribución homogénea de la heterocromatina en el nucleoplasma de los miocitos miolíticos (asociada a procesos de desdiferenciación celular) (Ausma y cols., 1999; Rücker-Martin y cols., 2002) y (8) cambios en la cantidad y localización de proteínas estructurales celulares (Allesie y cols., 2002; Aldhoon y cols., 2010).

Obviamente, las alteraciones en la estructura de la aurícula no están exclusivamente relacionadas con la FA y hay que tener en cuenta que la mayoría de los pacientes con FA son personas de edad avanzada y/o padecen otras enfermedades cardiovasculares que afectan a la estructura cardíaca. Sin embargo, se ha descrito que en pacientes con FA aislada existe una patología auricular que conlleva necrosis de los miocitos, miocarditis y fibrosis (Frustaci y cols., 1991 y 1997; Goette y cols., 2002).

El remodelado estructural provoca una heterogeneidad eléctrica del tejido auricular, disminuye la velocidad de conducción y provoca desacoplamiento eléctrico, facilitando la perpetuación de la FA (Nattel, 2002; Allesie y cols., 2002). Al contrario del remodelado eléctrico, los cambios estructurales son mucho menos reversibles y tienden a persistir tras la restauración del RS, lo que también explica por qué es tan probable la reinducción de la arritmia (Thijssen y cols., 2001; Aldhoon y cols., 2010).

De todos los factores que afectan a la estructura del miocardio auricular, los que han sido estudiados más extensamente son la fibrosis auricular y la alteración en la expresión de conexinas (Cx).

### 3.3.2.a. Fibrosis auricular

Se ha observado fibrosis auricular en biopsias tanto de pacientes con FA como de pacientes con factores de riesgo de FA (valvulopatías, enfermedad reumática cardíaca, cardiomiopatía dilatada, hipertrofia cardíaca y edad avanzada) (Schotten y cols., 2011). Las señales profibróticas actúan sobre el balance entre las metaloproteinasas (principales responsables de la degradación de la matriz extracelular) y sus inhibidores tisulares. También estimulan la proliferación de fibroblastos y el depósito extracelular de fibronectina, colágeno tipo I a III, proteoglicanos y otros componentes de la matriz extracelular (Aldhoon y cols., 2010).

El mecanismo concreto y las rutas de señalización implicadas en el desarrollo de fibrosis auricular son todavía poco conocidas. Sin embargo, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), la ruta intracelular del factor de crecimiento tisular  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), la inflamación y los radicales libres parecen ser los principales implicados en la aparición de fibrosis auricular.

- SRAA. Se ha descrito que el aumento de la angiotensina II tisular está relacionado con la presencia de fibrosis auricular (Cardin y cols., 2003). Un estudio de Boldt y cols (Boldt y cols., 2004) demostró que el receptor AT1 estaba sobreexpresado en la AI de pacientes con FA, sugiriendo la asociación entre el aumento de la actividad de la angiotensina II, el aumento de los componentes de la matriz extracelular y el desarrollo de FA. Los efectos de la angiotensina II sobre la composición de la matriz extracelular y la expresión de colágeno se deben, en parte, a que provoca un aumento de la producción TGF- $\beta_1$  en el miocardio (Kupfahl y cols., 2000; Campbell y Katwa, 1997). Un estudio en perros (Burstein y cols., 2007)

demostró que la activación de miocitos auriculares a elevadas frecuencias provocaba que estos liberaran angiotensina II, que actuaba aumentando la producción de TGF- $\beta_1$  que, a su vez, provocaba la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos secretores de proteínas de matriz extracelular.

- TGF- $\beta_1$ . El TGF- $\beta_1$  es una citocina profibrótica que controla la producción y composición de la matriz extracelular en muchos tejidos, entre ellos el miocardio ((Border y Noble, 1994; Khan y Sheppard, 2006). Tiene un papel destacado en la formación de escara tras infarto de miocardio o por hipertrofia cardíaca (Cipollone y cols., 2004). El papel del TGF- $\beta_1$  en el remodelado estructural ha sido demostrado en un modelo de ratón que sobreexpresaba una forma de TGF- $\beta_1$  constitutivamente activa (Verheule y cols., 2004). Estos ratones presentaban fibrosis auricular, heterogeneidad en la conducción eléctrica y mayor susceptibilidad a sufrir FA que los ratones control, a pesar de tener unos parámetros electrofisiológicos similares y una estructura y función ventricular normales. Recientemente se ha sugerido que la modificación de la vía de señalización TGF- $\beta_1$  podría ser una posibilidad en la prevención y tratamiento de la FA (Aldhoon y cols., 2010). Un estudio en perros tratados con pirfenidona (una molécula antifibrótica que reduce la expresión de TGF- $\beta_1$ ) (Lee y cols., 2006) mostró una reducción significativa del remodelado auricular y del riesgo de FA, asociadas a una disminución de la expresión de TGF- $\beta_1$  y del grado de fibrosis auricular. Posteriormente, se ha descrito que la relaxina podría ser un agente antifibrótico prometedor (Samuel y cols., 2007), aunque aun no se ha determinado su utilidad en la FA. Tanto las células auriculares como las ventriculares expresan receptores para relaxina. Esta hormona, que provoca cambios en la matriz extracelular del sistema reproductor femenino durante el embarazo, disminuye la expresión de TGF- $\beta_1$  y sus efectos sobre la síntesis de matriz extracelular y sobre la diferenciación de fibroblastos.

- Inflamación y especies reactivas de oxígeno. La evidencia de que el estrés oxidativo y la inflamación tienen relevancia en el remodelado estructural de la aurícula es cada vez mayor. Frustaci y colaboradores (Frustaci y cols., 1997) describieron que las biopsias auriculares de pacientes con FA aislada presentaban, además de fibrosis, infiltrado inflamatorio. El elevado índice de FA postquirúrgica resalta el papel de la inflamación en el desarrollo de la arritmia. La asociación causal entre inflamación y FA también fue propuesta por Bruins y cols (Bruins y cols., 1997), al observar en un grupo de pacientes sometidos a cirugía cardíaca, que el pico de incidencia de FA postquirúrgica coincidía con los niveles máximos de proteína C reactiva (PC<sub>R</sub>). La PC<sub>R</sub> es una proteína de fase aguda que forma parte



del sistema inmune innato. Se produce en el hígado en respuesta a las interleuquinas 1 y 6 (Kourilouros y cols., 2009). La elevación de los niveles plasmáticos de PC<sub>R</sub> se ha asociado con un aumento en el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares y su valor predictivo se ha validado en varios estudios epidemiológicos prospectivos (Ridker, 2003). Un estudio de cohortes con 5806 sujetos de edad  $\geq 65$  años (Avilés y cols., 2003) demostró que el nivel inicial de PC<sub>R</sub> era un predictor independiente de desarrollo de FA en un futuro. En otro estudio (Dernellis y Panaretou, 2001) en 50 pacientes con FA de reciente aparición, los sujetos con altos niveles de PC<sub>R</sub> fueron más propensos a la recurrencia de la FA tras cardioversión con amiodarona que los que presentaban niveles bajos, sugiriendo que la PC<sub>R</sub> podía ser un potente predictor de éxito en la cardioversión de FA.

Por otro lado, los principales efectores del daño oxidativo auricular parecen ser la NADPH-oxidasa miocárdica y la NO sintasa endotelial (Kim y cols., 2005). Un análisis del perfil de transcripción genética del tejido auricular de pacientes con FA mostraba una tendencia a la expresión de genes pro-oxidativos (Kim y cols., 2003). Además, Mihm y cols (Mihm y cols., 2001) demostraron que el daño oxidativo en el miocardio auricular de pacientes con FA se debe principalmente a la acción local de radicales hidroxilo y peroxinitrito.

El estudio de los mecanismos de remodelado estructural ha dado lugar al desarrollo de un nuevo concepto en la terapéutica de la FA, denominado terapia primaria (*upstream therapy*) que consiste en el uso de fármacos no antiarrítmicos que pretenden modificar de forma específica etapas concretas de los mecanismos que generan y mantienen la FA. Las principales dianas en la prevención primaria son la fibrosis auricular, la inflamación y el estrés oxidativo, aunque también se consideran los efectos directos e indirectos sobre los canales iónicos auriculares, las uniones estrechas y el manejo del Ca<sup>2+</sup> intracelular. Los agentes terapéuticos utilizados con este motivo incluyen a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (IECA), los antagonistas del receptor AT1, las estatinas y probablemente, los corticoesteroides. Los estudios en animales de experimentación parecen demostrar que estos fármacos tienen un efecto protector frente al remodelado estructural y eléctrico asociado con la FA. Aunque no se han desarrollado estudios aleatorizados controlados sobre el uso exclusivo de estos fármacos en la prevención primaria de la FA, los análisis retrospectivos de estudios en los que la FA era un objetivo secundario han mostrado que los IECA y los antagonistas del receptor AT1 disminuyen la incidencia de FA en pacientes con disfunciones cardíacas concomitantes significativas (disfunción del VI o

hipertrofia), y que el tratamiento previo con estatinas reduce la incidencia de FA postquirúrgica. Las guías europeas para el tratamiento de la FA incluyen recomendaciones para la prevención primaria de FA en estos grupos de pacientes. Sin embargo, por el momento no existen evidencias suficientes como para ampliar las indicaciones de estos fármacos al tratamiento de todos los pacientes con FA. No obstante, si un paciente recibe inhibidores del SRAA o estatinas para el tratamiento de cualquier otra enfermedad concomitante (insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, enfermedad coronaria, etc.), probablemente pueda beneficiarse de la protección que, en principio, pueden ofrecerle estos tratamientos frente a la FA (Savelieva y cols., 2011a).

Por el contrario, los resultados del uso de estos mismos fármacos en prevención secundaria (es decir, para prevenir la reincidencia de FA, una vez la enfermedad ya se ha establecido) son poco prometedores. A pesar de que los resultados de pequeños estudios o análisis retrospectivos en determinadas categorías aisladas de pacientes han sido positivos, estudios controlados aleatorizados con una mayor población han dado lugar a controversias y resultados, en su mayoría, negativos. Por el momento no ha podido determinarse si el uso de estos tratamientos en prevención secundaria tiene efectos en la mortalidad y el número de eventos cardiovasculares mayores en los pacientes con FA. Este resultado no es sorprendente, ya que si el remodelado estructural de la aurícula está muy avanzado, es difícilmente reversible. Por lo tanto, todo apunta a que sólo se pueden alcanzar resultados satisfactorios si la FA es detectada y tratada en etapas tempranas, antes de que la estructura auricular se haya remodelado (Savelieva y cols., 2011b).

### 3.3.2.b. Alteraciones en la expresión de conexinas

Las Cx son una familia de proteínas sarcolemales. Seis Cx oligomerizan formando un hemicanal o *conexón*, y dos conexones de dos células adyacentes forman un canal intercelular, que pone en comunicación directa los citoplasmas de las dos células adyacentes, permitiendo la transferencia de iones y pequeñas moléculas de hasta 1kDa. Las agrupaciones de estos canales intercelulares formados por Cx se denominan *uniones estrechas*, estructuras que se sitúan predominantemente en los discos intercalares del extremo terminal de los miocitos, y permiten la transmisión del impulso eléctrico célula-célula. Las Cx más abundantes en la aurícula son la Cx43 (se expresa tanto en tejido auricular como ventricular), y la Cx40 (exclusivamente auricular) (Kourliourios y cols., 2009).

Se ha descrito una gran variedad de cambios en cuanto a la expresión y localización de Cx asociados a la FA y al remodelado auricular. No obstante, existen discrepancias que hacen complicada la interpretación de dichos resultados. En dos estudios que utilizaban modelos caninos de FA, se ha descrito un aumento en la expresión de Cx43 (Elvan y cols., 1997; Sakabe y cols., 2004), aunque en ninguno de los dos se estudió la expresión de Cx40. Van der Velden y cols. utilizaron un modelo de FA crónica en cabras, en el que describieron que la distribución de la Cx40 era discontinua y que esta heterogeneidad aumentaba con el tiempo. Además, a pesar de que los niveles y la expresión de Cx43 no se modificaban, el índice de expresión Cx40/Cx43 disminuía, dado que los niveles de Cx40 disminuían con la persistencia de la FA, (Van der Velden y cols., 1998 y 2000).

Los hallazgos más consistentes en estudios que utilizan muestras auriculares de pacientes con FA son un aumento de la expresión de Cx en las membranas laterales de los miocitos (*lateralización*) (Kostin y cols., 2002) y un aumento de la heterogeneidad en la distribución (Dupont y cols., 2001; Kanagaratnam y cols., 2004; Kostin y cols., 2002). Dos estudios mostraron un aumento en la expresión de Cx40 (Dupont y cols., 2001; Wetzel y cols., 2005); otros tres, una disminución (Kostin y cols., 2002; Nao y cols., 2003; Wilhelm y cols., 2006) y sólo uno no observaba modificaciones en la expresión (Kanagaratnam y cols., 2004). En cuanto a la Cx43, un estudio mostraba un aumento de la expresión (Wilhelm y cols., 2006), otro una disminución (Kostin y cols., 2002), y otros cuatro no observaban modificación de la expresión de Cx43 (Dupont y cols., 2001; Wetzel y cols., 2005; Nao y cols., 2003; Kanagaratnam y cols., 2004). En general, el único hallazgo consistente es que la heterogeneidad en la distribución de las Cx aumenta, probablemente porque tienden a desplazarse desde los extremos hacia los laterales del miocito. La heterogeneidad en la distribución de las Cx podría promover patrones de conducción anormales y favorecer la reentrada (Nattel y cols., 2007).

Además se han descrito mutaciones asociadas a cambios en la expresión de la Cx40. En un estudio con pacientes con FA aislada, se encontraron mutaciones en el gen que codifica la Cx40 en 4 de los 15 pacientes (Gollob y cols., 2006). En otro estudio se identificó un polimorfismo en el promotor del gen de la Cx40 que reducía la expresión de la proteína y se asocia a un mayor riesgo de sufrir FA (Firouzi y cols., 2004).

El deterioro en la comunicación célula-célula mediada por las uniones estrechas favorece el desarrollo de arritmias por reentrada (Duffy, 2008). En los últimos años ha comenzado la investigación en compuestos que aumentan la velocidad de conducción de los canales

formados por Cx, y que por tanto, en teoría, disminuirían el riesgo de desarrollar arritmias. Entre estos compuestos se incluyen los péptidos antiarrítmicos de primera (APP10 y ZP123) y segunda generación (GAP-134 y RXP-E) y péptidos que mimetizan la secuencia de las Cx (Gap 26 y Gap 27). Los resultados de los estudios con estas moléculas parecen prometedores. Sin embargo, aun es necesario determinar el peso que la disfunción de las Cx tiene en la génesis y el mantenimiento de la arritmia, para poder considerarlas agentes antiarrítmicos en la terapéutica de la FA (De Vuyst y cols., 2011).

### 3.3.3. Remodelado mecánico

La pérdida de la función contráctil auricular asociada a la FA fue documentada por primera vez en 1965 por Logan y colaboradores (Logan y cols., 1965). Más adelante, estudios ecocardiográficos describieron cómo la disfunción contráctil auricular se correlacionaba con la duración de la FA, es decir, si el paciente había estado en FA dos semanas, la función contráctil era recuperada a las 24 horas tras cardioversión, pero podría tardar más de un mes en recuperarse si la duración de la FA había sido de seis semanas (Manning y cols., 1994 y 1995). Mientras que la función auricular alterada tras paroxismos breves de FA parece ser el resultado de cambios en el metabolismo celular, las taquiarritmias auriculares de larga duración podrían inducir cambios adicionales causando una disfunción contráctil auricular más persistente (Schotten y cols., 2011). La consecuencia clínica más importante de la pérdida de la contractilidad auricular debida a la FA es la disminución de la velocidad del flujo sanguíneo en la aurícula, lo que contribuye significativamente al riesgo de tromboembolismo asociado a FA (Berger y Schweitzer, 1998). La pérdida de contractilidad auricular también potencia la dilatación auricular progresiva durante la FA y podría contribuir a la posterior estabilización de la arritmia (Schotten y cols., 2004). Por el contrario, la restauración del RS ha demostrado disminuir el tamaño de la aurícula (Gosselink y cols., 1993; Van der Velden y cols., 2000).

Los mecanismos responsables de la disfunción contráctil auricular asociada a la FA no se conocen del todo. En estudios clínicos y experimentales, el verapamilo era capaz de prevenir la disfunción auricular tras cortos periodos de FA, lo que sugería que la disfunción estaba causada por la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Leistad y cols., 1996; Daoud y cols., 1999). Algunos estudios destacan el papel de la disminución de la  $I_{\text{Ca,L}}$  como causa de la disfunción contráctil auricular (Sun y cols., 2001; Kneller y cols., 2002). Sin embargo, la recuperación del

remodelado eléctrico tras la cardioversión ocurre en 2-3 días, mientras que la contractilidad auricular tarda semanas o meses en restaurarse. Esto es indicativo de que la disminución de la  $I_{Ca,L}$  por sí sola no puede explicar la persistencia de la disfunción contráctil auricular tras FA prolongada (Schotten y cols., 2011). Utilizando muestras de orejuela auricular derecha (OAD) de pacientes sometidos a cirugía de la válvula mitral con FA crónica de larga duración se demostró que la fuerza contráctil se había reducido un 75% (Schotten y cols., 2001 y 2002). Sorprendentemente, la reserva contráctil y el contenido sarcomérico permanecían prácticamente inalterados, lo que sugiere que la contribución de la miolisis a la pérdida de la función contráctil es muy limitada. También las propiedades diastólicas se encontraban totalmente conservadas, sugiriendo que no había alteración en la función del retículo sarcoplásmico y además, la sensibilidad al estímulo  $\beta$ -adrenérgico se mantenía, al contrario de lo que ocurre en las taquimiocardiopatías ventriculares, por lo que la disfunción contráctil auricular tras FA prolongada debe ser causada por otros mecanismos (Schotten y cols., 2002).

Se ha sugerido que el estrés oxidativo (Mihm y cols., 2001) y la reducción en la fosforilación de proteínas miofibrilares (El-Armouche y cols., 2006) pueden ser mecanismos por los que se reduce la actividad del aparato contráctil en pacientes con FA. También se ha observado que la proteína C que se asocia con miosina se encuentra desfosforilada en pacientes con FA (El-Armouche y cols., 2006), lo que podría estar relacionado con la reducción de la contractilidad de las miofibrillas auriculares. Un estudio algo más reciente (Belus y cols., 2010) demostró que existen cambios traduccionales y post-traduccionales que aumentan la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  de las miofibrillas y alteran la contractilidad a nivel sarcomérico. Estos cambios podrían contribuir al mantenimiento de la arritmia y al desarrollo de dilatación auricular.

### 3.4. Tratamiento farmacológico de la FA

El tratamiento de los pacientes con FA tiene como objetivo reducir los síntomas y prevenir las complicaciones graves asociadas a la FA. Aunque se han desarrollado varias aproximaciones terapéuticas no farmacológicas (cirugía, ablación con catéter, cardioversión eléctrica), la terapia con fármacos antiarrítmicos es la base del tratamiento de la FA (Tamargo y cols., 2009). El tratamiento farmacológico de la FA recomendado en las guías terapéuticas actuales presenta dos estrategias principales: o bien la restauración y mantenimiento del RS, mediante el uso de antiarrítmicos de clase I y III (principalmente flecainida, propafenona y

amiodarona), o bien permitir el desarrollo de la FA pero controlar el ritmo ventricular, mediante el uso de fármacos depresores del NAV ( $\beta$ -bloqueantes, amiodarona, diltiazem y verapamilo). Además es esencial, en combinación con cualquiera de las dos estrategias, tratar al paciente con fármacos anticoagulantes para evitar trombosis y accidentes cerebrovasculares (Fuster y cols., 2006; Tamargo y cols., 2009; Aliot y cols., 2011; Camm y cols., 2010).

Cuanto más tiempo permanece el paciente en FA, más marcados son los cambios electrofisiológicos y estructurales auriculares, y por lo tanto, más difícil es la restauración del RS. En los estudios de seguimiento a largo plazo una proporción significativa de pacientes con FA paroxística progresaron a FA crónica (Kato y cols., 2004; de Vos y cols., 2010), sin embargo, el remodelado eléctrico producido por la FA puede ser revertido en algunos pacientes si se mantiene el RS desde etapas tempranas, lo que sugiere que un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado de la FA son críticos para evitar la progresión de la enfermedad (Hobbs y cols., 2000; Aliot y cols., 2011).

#### 3.4.1. Tratamiento agudo

El manejo agudo de los pacientes con FA se debe centrar en aliviar los síntomas y valorar el riesgo asociado a la FA. La evaluación clínica debe incluir la estimación del riesgo de sufrir accidentes cardiovasculares y la búsqueda de factores que predisponen a la FA y a complicaciones de la arritmia (Camm y cols., 2010). El tratamiento inicial de los pacientes con FA consiste en la protección aguda contra eventos tromboembólicos y en mejorar la función cardíaca.

La severidad de los síntomas relacionados con la FA debe ser la que haga decidir la estrategia entre la restauración del RS (en pacientes con síntomas graves) o el control del ritmo ventricular, aun manteniendo la fibrilación (en la mayoría de los pacientes) (Camm y cols., 2010). Los últimos algoritmos publicados recomiendan controlar la frecuencia ventricular inicialmente, aunque los ensayos clínicos han demostrado que a largo plazo no existen diferencias entre ambas estrategias en cuanto a supervivencia o morbilidad de los pacientes (Wyse, 2005). Estas mismas guías, sin embargo, indican que antes de optar por el control de la frecuencia ventricular, deben considerarse los efectos que puede provocar que el paciente sufra FA crónica (Aliot y cols., 2011). En realidad estas dos estrategias no tienen por qué ser excluyentes (Fuster y cols., 2006).

Varios estudios clínicos (PIAF, STAF, RACE, AF-CHF, HOT CAFE y AFFIRM) han demostrado que en pacientes ancianos con síntomas mínimos, el control de la frecuencia ventricular no se asociaba con un aumento de la mortalidad y morbilidad o con una disminución de la calidad de vida de los pacientes, en comparación con los pacientes a los que se les había restaurado el RS (Wyse y cols., 2002; Carlsson y cols., 2003; Hagens y cols., 2004; Hohnloser y cols., 2000; Marshall y cols., 2004; Opolski y cols., 2004; Roy y cols., 2008; Van Gelder y cols., 2002; Alboni y cols., 2004; Corley y cols., 2004; Wyse 2005; Aliot y cols., 2011). Es más, un meta-análisis (de Denus y cols., 2005) de los estudios PIAF, STAF, RACE, HOT CAFE y AFFIRM confirmó que en los pacientes con FA persistente o con alta probabilidad de recurrencia, la estrategia de control de la frecuencia ventricular con terapia antitrombótica concomitante era equivalente a la estrategia de restauración y mantenimiento del RS en cuanto a la prevención de eventos clínicos.

a) *Control agudo de la frecuencia ventricular.* Esta opción es la más adecuada en los pacientes con una respuesta ventricular rápida. El objetivo inicial es mantener una frecuencia ventricular en reposo inferior a 100 lpm, mediante la administración oral de verapamilo, diltiazem,  $\beta$ -bloqueantes o digoxina. En pacientes graves puede administrarse además, verapamilo o metoprolol intravenoso para reducir la velocidad de conducción del nodo AV. La tabla 14 resume las dosis, efectos secundarios e indicaciones de los fármacos que se utilizan en el control de la frecuencia ventricular. (Camm y cols., 2010).

	DOSIS	INDICACIONES	EFFECTOS ADVERSOS
<b>Digoxina</b>	i.v. 0.5-1 mg en bolo v.o. 0.0625-0.25 mg/día	Control de la frecuencia en reposo	Interacciones farmacológicas, taquiarritmias ventriculares, trastornos gastrointestinales, trastornos en la visión.
<b>Metoprolol</b>	i.v. 2.5-5 mg en bolo cada 5 min hasta 15 mg v.o. 25-200 mg/día	En pacientes con tono adrenérgico elevado e isquemia miocárdica	Hipotensión, bloqueo, insuficiencia cardíaca, broncoconstricción.
<b>Esmolol</b>	i.v. 0.5 mg /Kg carga inicial, seguido de dosis de mantenimiento 0.05-0.2 mg /Kg /min	En pacientes con tono adrenérgico elevado e isquemia miocárdica	Hipotensión, bloqueo, insuficiencia cardíaca, broncoconstricción.
<b>Propranolol</b>	i.v. 1-3 mg (máx 1 mg/min) v.o. 80-240 mg /3 veces/día	En pacientes con tono adrenérgico elevado e isquemia miocárdica	Hipotensión, bloqueo, insuficiencia cardíaca, broncoconstricción.

**Tabla 14. Fármacos para el control de la frecuencia ventricular.** (Adaptada de Lip y cols., 2012).

<b>Diltiazem</b>	<b>i.v.</b> 0.25 mg en bolo, seguido de 5-20 mg/h <b>v.o.</b> 40-80 mg /3 veces/día	Control de la frecuencia en tratamiento agudo	Hipotensión, bloqueo, insuficiencia cardíaca, trastornos gastrointestinales, interacciones farmacológicas.
<b>Verapamilo</b>	<b>i.v.</b> 5-20 mg en bolo <b>v.o.</b> 40-80 mg /3 veces/día	Control de la frecuencia en tratamiento agudo	Hipotensión, bloqueo, insuficiencia cardíaca, trastornos gastrointestinales, interacciones farmacológicas
<b>Amiodarona</b>	<b>i.v.</b> 5 mg /Kg en 1 h seguido de 0.5-1mg /min <b>v.o.</b> 100-200 mg/día	Control de la frecuencia en estados críticos e insuficiencia cardíaca	Flebitis, hipotensión, bradicardia, prolongación QT, <i>Torsades de pointes</i> , interacciones farmacológicas

**Tabla 14. (Continuación). Fármacos para el control de la frecuencia ventricular.** (*Adaptada de Lip y cols., 2012*).

b) *Reestablecimiento agudo del ritmo sinusal (Cardioversión)*. Muchos episodios de FA terminan de forma espontánea durante las primeras horas o días. En los pacientes que a pesar de tener el ritmo ventricular controlado continúen siendo sintomáticos, o en aquéllos en los que el objetivo perseguido a largo plazo sea un control del ritmo sinusal, se puede iniciar la cardioversión farmacológica de la FA mediante la administración de un bolo intravenoso de un fármaco antiarrítmico (Camm y cols., 2010). Los fármacos descritos en las guías terapéuticas para la cardioversión farmacológica de la FA de reciente comienzo son los siguientes:

-Flecainida. La mayoría de los pacientes revierten a RS en la primera hora después de la administración de un bolo intravenoso de flecainida (2 mg/Kg durante 10 min), con una restauración del RS del 67 al 92% a las 6 h post-administración. Está especialmente indicada en pacientes con FA de corta duración (> 24h), y debe evitarse en pacientes con cardiopatía estructural significativa (Camm y cols., 2010).

-Propafenona. Puede administrarse por vía intravenosa (2 mg/Kg durante 10 min) o por vía oral (450-600 mg), con un tiempo de cardioversión de entre 30 min y 2h, si la administración es intravenosa, y de 2 a 6 h si es oral. Debe evitarse en pacientes con cardiopatía estructural significativa y debido a su ligero efecto  $\beta$ -bloqueante, también debe evitarse en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva grave.

-Amiodarona. La cardioversión con amiodarona intravenosa (5 mg/kg durante 1 h y dosis de seguimiento de 50 mg/h) es más lenta que con flecainida o propafenona, tardando más de 24 la restauración del RS.



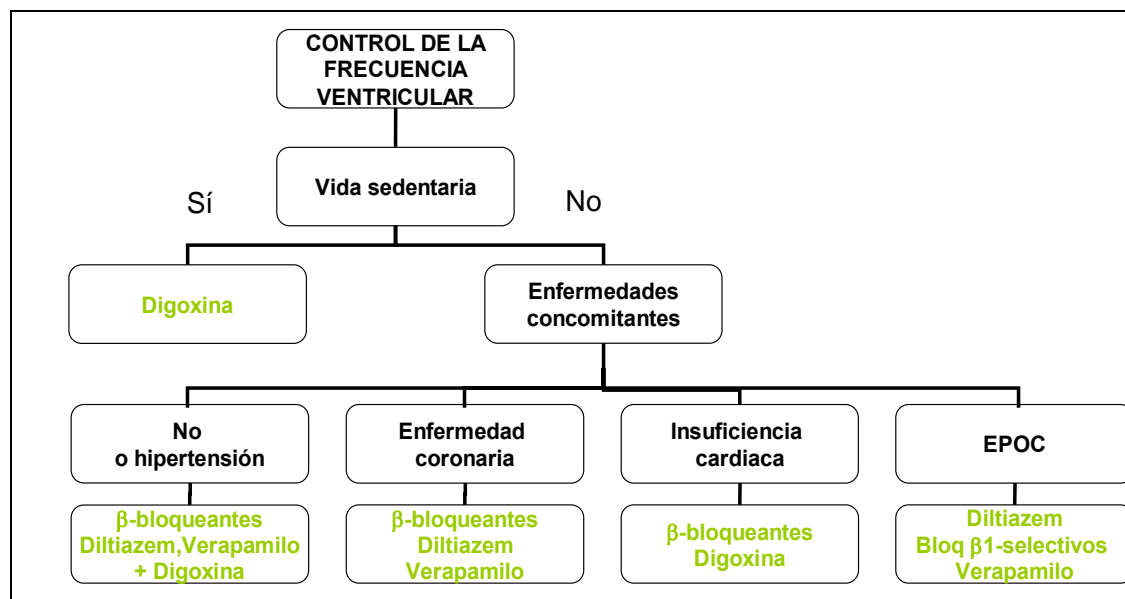
- Vernakalant. Ha sido aprobado recientemente por la Agencia Europea del Medicamento para la reconversión rápida de FA (3mg/kg durante 10 min, seguido de 15 min de observación y otra infusión intravenosa de 2 mg/kg durante 10 min). Está contraindicado en pacientes con presión arterial sistólica <100 mmHg, estenosis aórtica grave, insuficiencia cardíaca grave o prolongación del intervalo QT. En el estudio AVRO el vernakalant fue más efectivo que la amiodarona para la conversión rápida de FA de reciente inicio a RS (Camm y cols., 2011).

En general, el protocolo a seguir en el caso de pacientes con FA de reciente comienzo (< 48h) en los que se quiera revertir a RS y que no presenten inestabilidad hemodinámica, es la administración de flecainida, o propafenona si no presentan cardiopatía estructural significativa, o amiodarona si tienen cardiopatía estructural.

### 3.4.2. Tratamiento a largo plazo

a) *Control de la frecuencia ventricular a largo plazo*. Esta opción terapéutica persigue minimizar los síntomas y la morbilidad asociada a la FA, aun manteniendo la arritmia. Un ritmo irregular y una frecuencia ventricular rápida pueden causar síntomas como palpitaciones, disnea, fatiga y mareo. El control adecuado de la frecuencia ventricular puede reducir los síntomas y mejorar el estado hemodinámico, al permitir que haya tiempo suficiente para el llenado ventricular y prevenir la taquimiocardiopatía. Actualmente, el objetivo es mantener una frecuencia cardíaca en reposo inferior a 110 lpm en pacientes una función ventricular estable (fracción de eyección > 0.40) (Wang y cols., 2011).

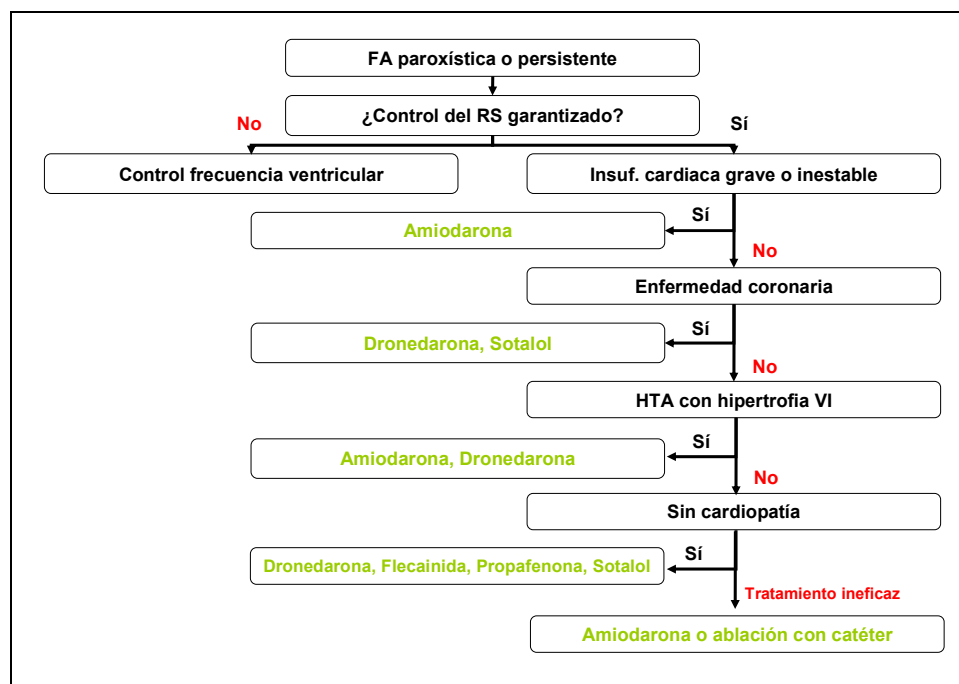
Los principales determinantes de la frecuencia ventricular durante la FA son la velocidad de conducción del nodo AV y el tono simpático y parasimpático. La elección de fármacos para el control de la frecuencia debe determinarse en función la edad, la presencia de cardiopatía subyacente y el estilo de vida del paciente. En general, los fármacos de primera elección son los  $\beta$ -bloqueantes y los antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  no dihidropiridínicos. La digoxina debe darse en pacientes sedentarios y puede añadirse al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes y antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  no dihidropiridínicos en los pacientes con frecuencias ventriculares descontroladas. Los  $\beta$ -bloqueantes deben ser la terapia de elección en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva crónica y disfunción del VI (Figura 36) (Lip y cols., 2012).



**Figura 36. Algoritmo de tratamiento para el control de la frecuencia ventricular en FA.** Los fármacos están ordenados por orden alfabético. (Adaptada de Lip y cols., 2012).

b) *Control del RS a largo plazo.* En pacientes con FA aislada o con cardiopatía estructural mínima el tratamiento de elección recomendado por las guías clínicas es flecainida, propafenona o sotalol (Camm y cols., 2010). La amiodarona es más efectiva para mantener el RS que la flecainida, la propafenona o el sotalol, pero debido a su perfil de toxicidad se debe utilizar sólo como una alternativa terapéutica si los fármacos de elección no funcionan y como tratamiento de elección en pacientes con insuficiencia cardíaca grave de clase funcional NYHA III o IV o inestable de clase II reciente.

Se ha demostrado que la dronedarona, un derivado de la amiodarona, produce una disminución del número de hospitalizaciones por eventos cardiovasculares en pacientes con FA paroxística, o tras cardioversión de FA persistente. Sin embargo, la dronedarona no debe ser administrada en pacientes con insuficiencia cardíaca de clase funcional NYHA III o IV ni con insuficiencia cardíaca descompensada en las 4 semanas anteriores, especialmente si presentan disfunción del VI (fracción de eyección del VI  $\leq 35\%$ ) (Figura 37) (Wann y cols., 2011). La tabla 15 resume las indicaciones, dosis y efectos adversos de los fármacos que actualmente se utilizan para el mantenimiento del RS.



**Figura 37. Algoritmo de tratamiento para el control del ritmo sinusal.** HTA: hipertensión arterial. Los fármacos están ordenados por orden alfabético. (Adaptada de Lip y cols., 2012).

	INDICACIONES	DOSIS	EFECTOS ADVERSOS
<b>Flecaínida</b>	FA aislada o FA con cardiopatía estructural mínima o sin cardiopatía estructural	v.o. 100-300 mg en 2 dosis	Arritmias, bradicardia, inotrópico negativo. No utilizar en pacientes con insuficiencia cardiaca, enfermedad coronaria y $\text{ClCr} < 50 \text{ mg/mL}$
<b>Propafenona</b>	FA aislada o FA con cardiopatía estructural mínima o sin cardiopatía estructural	v.o. 450-900 mg en 3 dosis	Arritmias, bradicardia, inotrópico negativo moderado, efectos sobre el aparato gastrointestinal. Seguridad poco conocida en pacientes con insuficiencia cardiaca y con enfermedad coronaria
<b>Sotalol</b>	FA aislada o FA con cardiopatía estructural mínima o sin cardiopatía estructural, o con enfermedad coronaria	v.o. 80-240 mg en 2 dosis	Bradicardia sinusal, bloqueo AV, efecto inotrópico negativo, <i>TdP</i> si hay hipokalemia. Evitar en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva
<b>Amiodarona</b>	FA con enfermedades cardiacas significativas o si no responden a otro tratamiento	v.o. dosis inicial de carga 600-800 mg/día y mantenimiento 100-200 mg/día	Fibrosis pulmonar, malestar gastrointestinal, disfunción tiroidea, efectos oculares y cutáneos. Ajustar dosis de warfarina y digoxina.
<b>Dronedaron</b>	FA aislada o FA con cardiopatía moderada	v.o. 400-800 mg en 2 dosis	Nauseas, vómitos, diarrea, <i>TdP</i> (poco común), ajustar la dosis al $\text{ClCr}$ , talla y edad. Ajustar dosis de warfarina y digoxina

**Tabla 15. Fármacos para el control del ritmo sinusal.**  $\text{ClCr}$ = Aclaramiento de creatinina *TdP*= Torsades de Pointes (Adaptada de Lip y cols., 2012).

### 3.4.3. Tratamiento antitrombótico

La terapia de anticoagulación debe prolongarse 4 semanas tras la cardioversión, excepto si la FA es de reciente inicio y no existen factores de riesgo. La cardioversión aumenta el riesgo de tromboembolismo, por lo que se considera indispensable el tratamiento anticoagulante en estos pacientes (Camm y cols., 2010).

El tratamiento con anticoagulantes orales a largo plazo es necesario si existen factores de riesgo de tromboembolismo, recurrencia de FA o presencia de trombos. Para valorar los factores de riesgo que presenta un paciente y la conveniencia de iniciar la terapia antitrombótica, actualmente se utiliza la puntuación CHAD<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc (insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, edad  $\geq 75$  [doble], diabetes mellitus, accidente cardiovascular previo [doble], enfermedad vascular, edad 65-74 años y categoría de sexo [femenino]) (Camm y cols., 2010). Las guías terapéuticas actuales recomiendan anticoagulación oral en aquellos pacientes con una puntuación CHAD<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc  $\geq 2$  y o bien anticoagulación oral (preferentemente), o bien 75-325 mg de ácido acetilsalicílico en pacientes con una puntuación =1. Se persigue que los pacientes mantengan un tiempo de protrombina según el índice internacional normalizado (INR) entre 2 y 3. Se ha demostrado que el tratamiento anticoagulante es más efectivo que la antiagregación en la reducción del riesgo de ictus y otros accidentes vasculares mayores en las pacientes con FA sin valvulopatía (Aguilar y cols., 2007). La anticoagulación comparada con placebo reduce de manera significativa la incidencia de ictus y es tres veces más efectiva que el ácido acetilsalicílico (Manning y cols., 2011).

Principalmente se utilizan *antagonistas de la vitamina K* (warfarina y derivados dicumarínicos). Se ha demostrado que reducen de manera significativa el riesgo de ictus en los pacientes con FA, en comparación con aspirina o con placebo (Lip y cols., 2012). Sin embargo, debido al mayor riesgo de sangrado que presentan estos fármacos, el ajuste de la dosis para mantener un INR de entre 2-3 es particularmente importante en los pacientes de edad avanzada. Además, se están desarrollando varios fármacos anticoagulantes para la prevención de accidentes cardiovasculares en pacientes con FA, que se agrupan en dos clases, los *inhibidores directos de la trombina* (como el dabigatrán y el AZD0837) y los *inhibidores del factor Xa* (rivaroxabán, apixabán, edoxabán, betrixabán, YM150, etc). El estudio RE-LY (Randomized Evaluation of Long-term anticoagulant therapy with dabigatran etexilate) (Conolly y cols., 2009) en el que se comparan la eficacia y seguridad del dabigatrán y la

warfarina, demostró que el dabigatrán podría ser una alternativa al uso de antagonistas de la vitamina K, aunque no se observó una disminución de la mortalidad significativa en el grupo de dabigatrán (Manning, 2011; Connolly, 2010). El dabigatrán no precisa monitorización del INR, es menos susceptible de interacciones con alimentos o fármacos y su ventana terapéutica es mayor que la de los antagonistas de la vitamina K. Un estudio sobre el índice coste-efectividad del dabigatrán (Shah y Gage, 2011) concluyó que su uso es coste-efectivo en pacientes con FA y riesgo elevado de sangrado o de ictus, a menos que el control de INR con antagonistas de la vitamina K sea excelente. Sin embargo, en la actualidad, estos fármacos se encuentran en desarrollo y por el momento no están incluidos en las guías terapéuticas europeas ni americanas.

Por otra parte, la oclusión de la orejuela auricular izquierda (OAI), considerada el principal sitio de formación de trombos auriculares, puede reducir el riesgo de tromboembolismo. Los pacientes en los que está contraindicada la terapia crónica con anticoagulantes, pueden ser candidatos para la oclusión de la OAI. Sin embargo, el estudio PROTECT AF (WATCHMAN Left Atrial Appendage System for Embolic PROTECTion in Patients with Atrial Fibrillation) (Holmes y cols., 2009) con 707 pacientes sometidos a oclusión de la OAI, mostró que había un mayor índice de efectos adversos (principalmente debidos a complicaciones perioperatorias) en el grupo que había sido intervenido que en el grupo control (Holmes y cols., 2009).

En general, los fármacos antiarrítmicos utilizados actualmente para el tratamiento de la FA son útiles, pero su efecto es limitado, debido, principalmente al remodelado auricular causado por la FA (Cosío y Delpón, 2001; Tamargo y cols., 2004a). Además, tienen efectos secundarios que limitan su uso en muchos subgrupos de pacientes. Es necesario que un nuevo antiarrítmico sea capaz de demostrar seguridad en estudios aleatorios controlados que incluyan complicaciones clínicas como eventos cardiovasculares y mortalidad (Prystowsky y cols., 2010). Sin embargo, el avance en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la génesis y mantenimiento de la FA es la herramienta indispensable para la búsqueda de nuevos fármacos antiarrítmicos con un perfil de efecto y seguridad adecuados.

## 4. CONTROL SIMPÁTICO DE LA FUNCIÓN CARDIACA

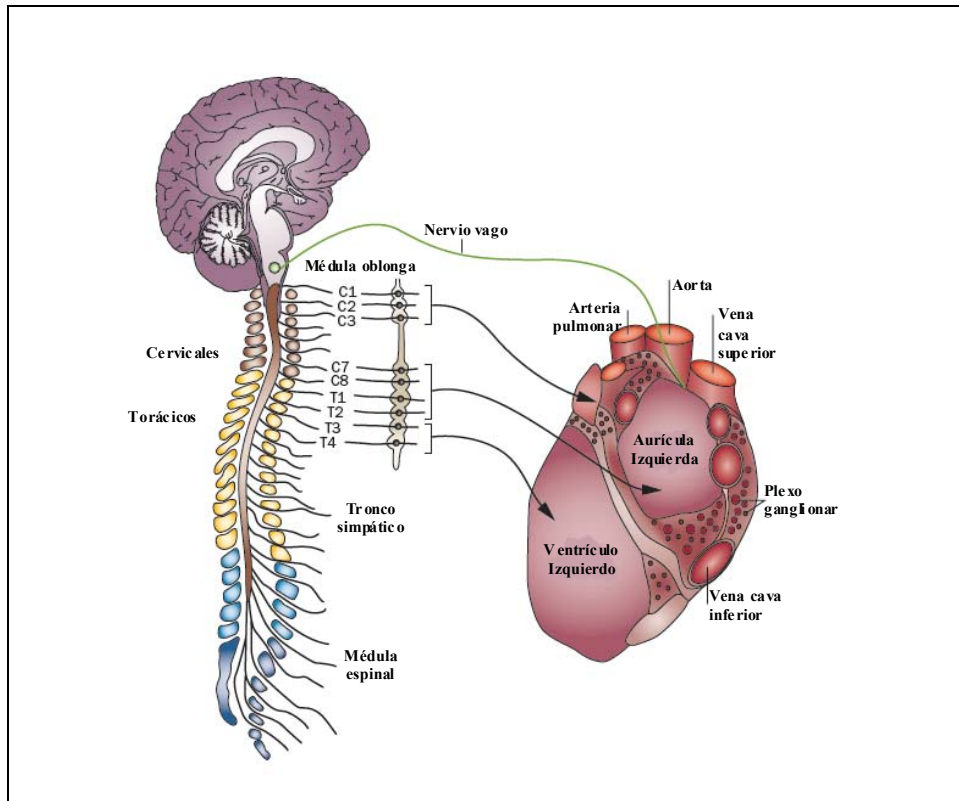
El control autónomo del sistema cardiovascular permite el ajuste de la función cardíaca y de los vasos sanguíneos a condiciones tan distintas como el sueño o el ejercicio. Aunque la iniciación del impulso cardíaco es miógena y se mantiene tras extraer el corazón y profundirlo con una solución fisiológica oxigenada, el tono vegetativo ejerce una importante modulación tanto de la frecuencia, como de la contractilidad cardíacas. La actividad automática del nodo SA está bajo control vegetativo, y en condiciones fisiológicas predomina el tono parasimpático-vagal (Delpón y Tamargo, 2010). De hecho, la activación de receptores adrenérgicos representa el mecanismo primario de activación cardíaca durante el estrés (Xiang, 2011).

### 4.1. Sistema simpático cardíaco

Los nervios simpáticos cardíacos se originan en los segmentos torácicos superiores (T1-T6) y en los dos últimos segmentos cervicales de la médula espinal, atraviesan los ganglios paravertebrales de la cadena simpática torácica y hacen sinapsis con neuronas posganglionares, fundamentalmente en los ganglios cervical medio y estrellado. Las fibras posganglionares simpáticas que parten de ellos se unen a las fibras parasimpáticas para formar el plexo cardíaco y se distribuyen de forma homogénea por todo el corazón (Figura 38) (Delpón y Tamargo, 2010).

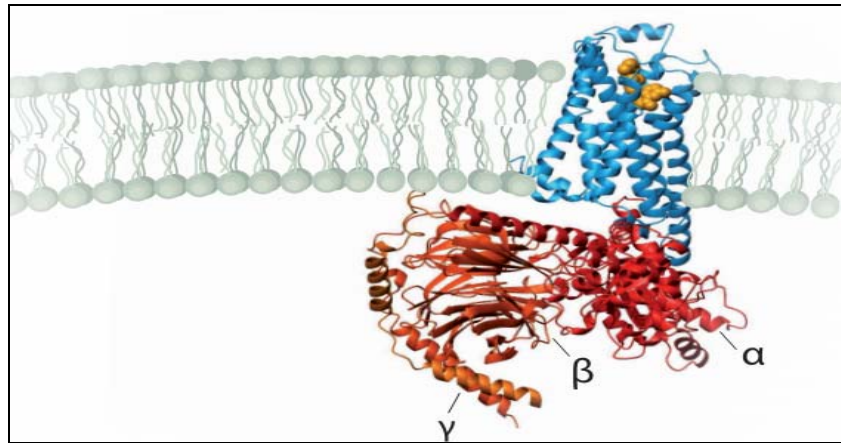
Hasta el momento, se han identificado nueve subtipos de receptores adrenérgicos en mamíferos:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ . Se ha descrito un cuarto tipo de receptor  $\beta$ , el  $\beta_4$ , aunque aun no se sabe claramente si se trata únicamente de un estado de baja afinidad del propio receptor  $\beta_1$  (Molenaar y Parsonage, 2005). En el corazón humano, los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  adrenérgicos son el mecanismo fisiológico más potente para aumentar la actividad cardíaca de forma aguda (Brodde y cols., 2006). Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Figura 36) pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Se caracterizan por tener 7 dominios TM que forman un bolsillo en el cual los agonistas y antagonistas competitivos tienen sus sitios de unión (Figura 39). Además, tienen tres lazos extra e intracelulares. El primer y segundo lazo extracelular se asocian mediante un puente disulfuro y tienen un papel muy importante en la conformación que adopta el receptor. Estos receptores tienen también un dominio N-terminal extracelular y una cola C-terminal

citósólica, que contiene sitios de fosforilación para las kinasas de las proteínas G acopladas al receptor (GRKs) (Wallukat, 2002; Rasmussen y cols., 2011).



**Figura 38. Innervación autónoma del corazón.** [Adapt de Shen y cols., 2012]

En el tejido cardíaco, el receptor  $\beta_1$ -adrenérgico es el predominante, aunque coexiste con el  $\beta_2$ , en una proporción  $\beta_1:\beta_2$  70:30 en la aurícula y 80:20 en el ventrículo (Brodde y Michael, 1999). El receptor  $\beta_1$ -adrenérgico tiene un papel principal en cuanto a efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos en las células cardíacas (Christ y cols., 2011), mientras que el receptor  $\beta_2$  produce sólo un moderado efecto cronotrópico (Xiang y cols., 2003; Xiao y cols., 2006; Xiang, 2011). En general, la respuesta neta auricular a la estimulación catecolaminérgica de receptores adrenérgicos depende del tipo de catecolamina y de la densidad y sensibilidad relativa del subtipo de receptor adrenérgico y además, puede variar en caso de patología (Workman, 2010).



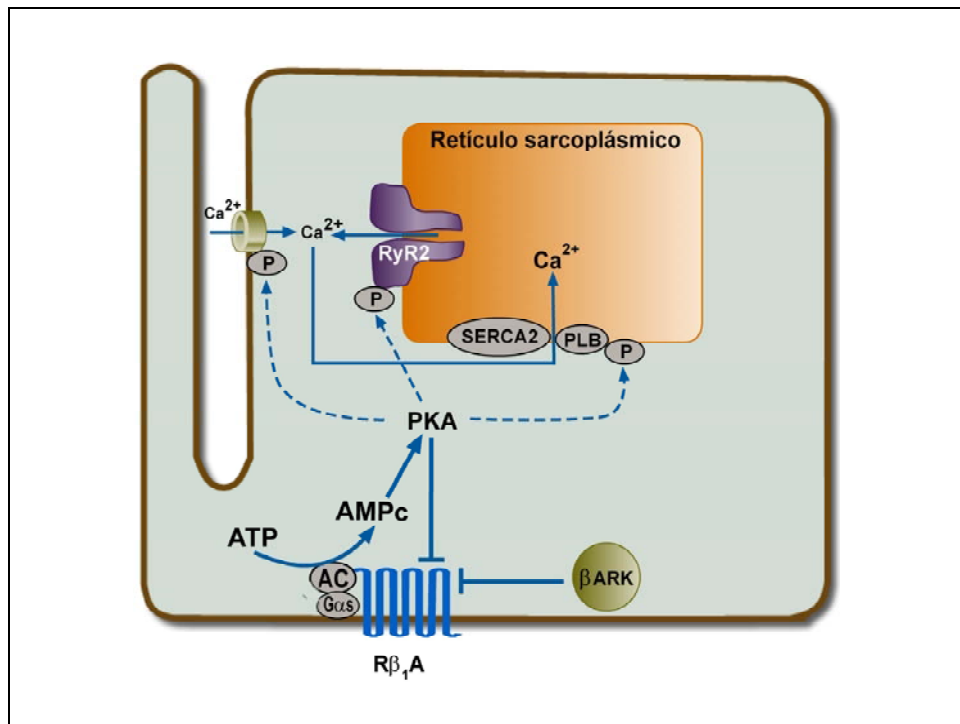
**Figura 39. Estructura del receptor  $\beta$ -adrenérgico.** Receptor  $\beta$ -adrenérgico (en azul) acoplado a una proteína G, con sus tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (en rojo), mientras es activado por un agonista (en amarillo) [Adapt. de Rasmussen y cols, 2011].

Tanto la noradrenalina liberada por los nervios simpáticos cardíacos, como la adrenalina circulante liberada desde la médula adrenal, estimulan los receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos provocando un cambio conformacional en los mismos que favorece el acoplamiento con la proteína  $G_s$  y su activación, lo que a su vez provoca la estimulación de la adenilato ciclasa (AC), incrementando los niveles celulares de AMPc. Esta molécula va a funcionar como un segundo mensajero que difunde dentro de distintas localizaciones subcelulares, donde activa a la PKA (Mauban y cols., 2009). La PKA fosforila la subunidad  $\alpha_1$  de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L cardíacos y facilita su apertura. El resultado es un aumento de la entrada de  $Ca^{2+}$ , de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la contractilidad y la frecuencia cardíacas. Además, la estimulación de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos activa una cinasa que fosforila las cadenas ligeras de la miosina (MLC-2), lo que aumenta la sensibilidad de las proteínas contráctiles al  $Ca^{2+}$ . Es decir, las catecolaminas aumentan la contractilidad cardíaca por aumentar la  $[Ca^{2+}]_i$  y la sensibilidad de las proteínas contráctiles al  $Ca^{2+}$  (Figura 40).

El resultado final de todos estos efectos es un aumento de los volúmenes latido y minuto cardíacos. Además, la activación de la PKA fosforila otras proteínas, por un lado, al fosfolambano, que estimula la actividad de la SERCA y acelera la captación de  $Ca^{2+}$  hacia el interior del retículo sarcoplásmico, y por otro, a la troponina I, que acelera la velocidad de disociación del complejo  $Ca^{2+}$ -troponina T y disminuye la sensibilidad de la troponina T por el  $Ca^{2+}$ . Estos cambios se traducen en una rápida disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  durante la diástole, una disociación de los enlaces cruzados entre la actina y la miosina, y una relajación más rápida de la célula cardíaca, es decir, la estimulación  $\beta$ -adrenérgica produce un efecto lusitrópico positivo (Delpón y Tamargo, 2010).



La localización en la membrana de los receptores  $\beta$  y los complejos a los que se asocian dictan la compartimentación de la cascada de señalización. La intensidad de los efectos de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica sobre los cardiomiocitos depende de multitud de factores, entre los que destacan el equilibrio entre la producción y la degradación de AMPc mediada por fosfodiesterasas (PDEs) y la acción de las arrestinas como un agonista dosis-dependiente que promueve la difusión y propagación del AMPc a los compartimentos intracelulares mediante el secuestro de determinadas isoformas de PDE (Xiang, 2011). La posibilidad de realizar una caracterización bioquímica de la organización de los distintos subtipos de ACs y PDEs asociadas a cada subtipo de receptor  $\beta$ -adrenérgico ha mejorado la comprensión de la fina regulación de esta ruta de señalización que, en principio, comparten multitud de cascadas. (De Arcangelis y cols., 2010).



**Figura 40. Esquema de la cascada de señalización inducida por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.** La estimulación por catecolaminas activa la adenilato ciclasa (AC) vía proteína  $G_{\alpha s}$  resultando en una generación masiva de AMPc, que activa la Proteína quinasa A (PKA), capaz de fosforilar distintas proteínas celulares. La fosforilación del canal de  $Ca^{2+}$  tipo L aumenta la entrada de  $Ca^{2+}$  provocando una liberación de  $Ca^{2+}$  estimulada por el propio  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico, a través del RyR2, que también es fosforilado por la PKA. El fosfolambano (PLB) regula a la SERCA 2A. El PLB no fosforilado inhibe la actividad de la SERCA. Tras la fosforilación del PLB por la PKA, esta inhibición es abolida y el transporte de  $Ca^{2+}$  desde el citosol hasta el retículo, mediado por SERCA aumenta. La fosforilación del propio receptor  $\beta$  por la PKA induce el desacoplamiento y la desensibilización del mismo. Este desacoplamiento también está mediado via fosforilación con la quinasa de proteínas G del receptor  $\beta$ -adrenérgico ( $\beta$ -ARK). Esta quinasa sólo se activa cuando el receptor se encuentra ocupado por agonistas. [Adapt. de Wallukat, 2002]

La evidencia acumulada demuestra que el receptor  $\beta$ -adrenérgico, la proteína Gs y la AC forman complejos preformados para facilitar la transducción de la señal. De hecho, se sabe que cuando el receptor está pre-asociado a la proteína Gs muestra una mayor afinidad por sus ligandos que cuando se presenta libre de la proteína (Weitl y Seifert, 2008). Además, es bien conocido que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se asocian a una gran variedad de proteínas de anclaje. En el caso de los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  adrenérgicos, la principal proteína de anclaje es la *A-kinase anchoring protein-79* (AKAP-79) (Gardner y cols., 2006, Xiang 2011). En miocitos cardíacos, la AC VI se puede coimmunoprecipitar con el receptor  $\beta_1$ -adrenérgico (De Arcangelis y cols., 2010), lo que indica que éste podría estar conectado con la AC vía AKAP-79 (Xiang, 2011).

Además, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos colocalizan también con otras proteínas de anclaje que tienen dominios PDZ (*Post synaptic density, Discs large, and Zonula occludens*) capaces de unir cinasas, como la PKA, reforzando la hipótesis de que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos forman complejos pre-asociados junto con la proteína G y proteínas de anclaje capaces de unir AC y cinasas mediante dominios específicos (Shcherbakova y cols., 2007).

La duración y distribución de las señales mediadas por AMPc pueden ser alteradas mediante la actividad de las PDE (Zaccolo y Pozzan, 2002; Willoughby y cols., 2006). Estas enzimas tienen un papel crítico en el confinamiento espacio-temporal del AMPc en los miocitos cardíacos sometidos a estimulación adrenérgica.

Las PDE se dividen en 11 familias según su homología en la secuencia aminoacídica, su especificidad de sustrato y sus propiedades farmacológicas (Conti y Beavo, 2007). Al menos 6 de las 11 familias se expresan en corazones animales (PDE1, PDE2, PDE3, PDE4, PDE5 y PDE8) (Miller y Yang, 2010), de las cuales, la PDE3 y la PDE4 tienen un importante papel en el miocardio humano. La familia PDE3 está formada por la PDE3A y por la PDE3B, mientras que la familia PDE4 se compone de PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D (Conti y Beavo, 2007). En estado de reposo, tanto la actividad PDE3 como la PDE4, modulan la concentración basal intracelular de AMPc hidrolizando continuamente el AMPc que producen las AC constitutivamente activas en los miocitos cardíacos. Bajo estimulación adrenérgica, las PDE controlan tanto la duración, como la amplitud de las señales mediadas por AMPc (Soto y cols., 2009; Monguillo y cols., 2004). La determinación de la actividad del AMPc en miocitos tanto neonatales como adultos, ha confirmado el papel crítico de la familia PDE4 en el control

del AMPc generado por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica (De Arcangelis y cols., 2010; Zaccolo y Pozzan, 2002; Soto y cols., 2009; Willoughby y cols., 2006; Monguillo y cols., 2004). Las isoformas de PDE3 parecen estar involucradas en la regulación del contenido de AMPc en el ciclo del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (Kerfant y cols., 2007).

El resultado de la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se traduce en: 1) un aumento de la inclinación de la fase 4 y de la frecuencia de disparo del nodo SA y de los marcapasos ectópicos, 2) un incremento de la contractilidad y de la velocidad de relajación, 3) un aumento de la excitabilidad y la velocidad de conducción intracardíaca, y 4) un acortamiento del periodo refractario y un aumento de la velocidad de conducción a través del nodo AV, facilitando el paso de impulsos de la aurícula al ventrículo. Casi todas estas acciones son consecuencia del aumento de la  $I_{\text{CaL}}$  producido por las catecolaminas y pueden inhibirse tras la administración de antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. En situaciones en las que aumenta el tono simpático (estrés, ansiedad) la frecuencia cardíaca puede acelerarse hasta los 100 latidos/min, mientras que durante el ejercicio físico intenso puede llegar a alcanzar los 180 latidos/min (Delpón y Tamargo, 2010).

#### **4.2. Efectos de la estimulación $\beta$ -adrenérgica en el PA y en las corrientes iónicas auriculares**

Se ha demostrado en miocitos auriculares de pacientes en RS que el isoproterenol [(ISO) un agonista  $\beta$ -adrenérgico] prolonga la DPA medida al 50% de la repolarización ( $\text{DPA}_{50}$ ), sin modificar el PR ni la amplitud del PA (Redpath y cols., 2006). Esto es debido a que la estimulación simpática modifica las distintas corrientes iónicas implicadas en la génesis del PA. La amplitud de la  $I_{\text{CaL}}$  es el principal determinante de la fase de meseta del PA. Se ha demostrado de forma consistente que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica aumenta muy marcadamente la  $I_{\text{CaL}}$  (Ouadid y cols., 1995; Pelzmann y cols., 1995; Van Wagoner y cols., 1999; Christ y cols., 2004; Redpath y cols., 2006; Greiser y cols., 2007), mediante un aumento en la probabilidad de apertura del canal. La influencia de la  $I_{\text{CaL}}$  sobre la fase de meseta del PA se equilibra principalmente con las corrientes repolarizantes de  $\text{K}^+$   $I_{\text{to}}$  e  $I_{\text{Kur}}$ . Recientemente se ha descrito que el ISO 1  $\mu\text{M}$  no modifica la  $I_{\text{to}}$  humana (Marshall y cols., 2012). Por lo que respecta a la  $I_{\text{Kur}}$ , parece ser muy poco sensible a la estimulación simpática, ya que son necesarias dosis elevadas de ISO para observar un aumento en la densidad de esta corriente (Li y cols., 1996b; Tamargo y cols., 2004b). Por lo tanto, la prolongación de la

DPA<sub>50</sub> descrita en el tejido auricular humano se explicaría en base al marcado aumento de la  $I_{Ca,L}$  producido por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica.

Por otro lado, la estimulación  $\beta$ -adrenérgica parece aumentar la  $I_{Kr}$  (Heath y Terrar, 2000) aunque no existen datos en aurícula humana, ya que es una corriente muy pequeña, e incluso no presente en algunos miocitos (Wang y cols., 1994; Schaffer y cols., 1998). En cuanto al resto de corrientes auriculares implicadas en la fase terminal de la repolarización ( $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{KACH}$  e  $I_{KATP}$ ) los datos existentes sobre el efecto de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica proceden de modelos animales y es necesario un mayor estudio de los efectos de la estimulación simpática en muestras de aurícula humana.

#### 4.3. Estimulación $\beta$ -adrenérgica y fibrilación auricular

El papel de la activación simpática en la FA no está demasiado claro por el momento, sin embargo, algunos datos hacen pensar que podrían estar relacionadas. Por una parte, se sabe que en pacientes con FA paroxística el tono simpático aumenta inmediatamente antes de sufrir un episodio diurno de FA, mientras que el tono vagal permanece inalterado (Tomita y cols., 2003). Además, se ha observado que en pacientes sometidos a cirugía cardíaca disminuye el tono vagal y aumenta el tono simpático en los instantes previos a un episodio de FA postquirúrgica (Dimmer y cols., 1998). Cuatro estudios en humanos, tres de ellos en fibras auriculares (Sleator y De Gubareff, 1964; Wang y cols., 2006; Yeh y cols., 1992) y uno en miocitos auriculares aislados (Redpath y cols., 2006) demostraron que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica provocaba conducción fibrilatoria. También se ha descrito que la infusión con ISO produjo FA en un 5% de pacientes sin historia previa de FA y en un 84% de pacientes con FA paroxística (Oral y cols., 2008). En otro estudio, la estimulación mediante electrodo de los nervios autonómicos de las VP producía una rápida activación arrítmica de las VP, que era abolida con atenolol, un antagonista  $\beta_1$  selectivo (Patterson y cols., 2005).

Por otro lado, la inervación adrenérgica puede modificarse por la presencia de enfermedades miocárdicas asociadas a la FA, y también por una activación auricular rápida persistente, provocando el denominado *remodelado nervioso* (Workman, 2010). Un estudio comparativo entre pacientes en RS y con FA persistente en el que se cuantificaba el grado de inervación en muestras de OAD de estos pacientes, demostró que las muestras procedentes de pacientes con FA estaban significativamente más inervadas, sugiriendo que la FA produce también un remodelado de la inervación simpática que puede formar parte del remodelado

auricular. El miocardio de estos pacientes presentaba también un aumento de la NA tisular (Gould y cols., 2006).

Por último, el tratamiento a largo plazo con  $\beta$ -bloqueantes ha demostrado provocar cambios adaptativos en la electrofisiología auricular, en la contracción y en la expresión de receptores adrenérgicos. Este *remodelado farmacológico* fue originalmente demostrado en conejos, en un estudio en el que tras 6 días de tratamiento con un bloqueante  $\beta_1$ -selectivo o con uno mixto se observaba una prolongación de la DPA en la aurícula y en el ventrículo (Raine y Vaughan Williams, 1981). Un meta-análisis basado en 7 estudios aleatorizados, controlados mediante placebo demostró que en pacientes con insuficiencia cardiaca el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes disminuía la incidencia de FA independientemente del estado funcional del paciente (Nasr y cols., 2007). Otro estudio, desarrollado para determinar la eficacia de la terapia con fármacos  $\beta$ -bloqueantes tras cirugía cardiovascular en la reducción de la incidencia y severidad de los casos de FA postquirúrgica obtuvo como resultado que el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes controlaba significativamente el número de casos de FA postquirúrgica y la gravedad de los mismos (Ali y cols., 1997). Recientemente se ha descrito una disminución significativa en las densidades de la  $I_{to1}$  y la  $I_{K1}$  en muestras auriculares de pacientes en RS sometidos a tratamiento crónico con  $\beta$ -bloqueantes (Marshall y cols., 2012), lo que podría explicar, en parte, la prolongación de la DPA observada en los pacientes sometidos a este tipo de tratamiento (Workman y cols., 2003).

Sin embargo, se desconoce cómo la estimulación adrenérgica puede provocar o favorecer la FA, tanto a nivel molecular como electrofisiológico. La demostración de esta hipótesis tendría una importante relevancia terapéutica puesto que implicaría que el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes podría ser útil como coadyuvante en el manejo de la FA paroxística a fin de evitar que se cronifique, con las complicaciones que esto conlleva.

## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



En la actualidad, la FA representa un importante problema sanitario por varios motivos: a) es la arritmia con mayor prevalencia en la población general y la que más hospitalizaciones y gastos sanitarios origina. Su prevalencia aumenta con la edad, por lo que con el envejecimiento progresivo de la población es de preveer que siga aumentando su incidencia. b) La FA duplica la mortalidad del paciente independientemente de otros factores de riesgo. c) La FA desorganiza completamente la contractilidad auricular provocando la aparición de zonas de flujo turbulento y otras donde se produce remansamiento sanguíneo, favoreciendo la aparición de trombos intra-auriculares hasta en un 26% de los pacientes lo que explica parcialmente, el aumento de la incidencia de eventos tromboembólicos e ictus producido por la FA.

La FA *per se*, altera las propiedades electrofisiológicas auriculares de modo que promueve su propio mantenimiento y recurrencia. Este fenómeno, denominado *remodelado eléctrico* consiste, fundamentalmente, en el acortamiento del periodo refractario auricular y, por ende, de la DPA. Además se acompaña de alteraciones contráctiles y estructurales progresivas del tejido auricular que crean el substrato perfecto para la perpetuación de la arritmia. A pesar de los avances en el estudio de la FA, no se ha identificado un factor único que pueda considerarse la causa y el responsable del mantenimiento de la FA. Los datos disponibles hasta el momento, sugieren que la patogénesis de la FA es multifactorial. Las aproximaciones terapéuticas actuales tienen importantes limitaciones, por lo que es necesario un mejor conocimiento de los mecanismos de la patología, que permita desarrollar nuevos tratamientos más adecuados.

Para entender las alteraciones que la FA provoca en las propiedades auriculares, es necesario conocer en profundidad la electrofisiología de las células auriculares. Es un hecho conocido que en humanos, como en otras especies, el periodo refractario de la AI es más corto que el de la AD, lo que sugiere la existencia de diferencias inter-auriculares en las corrientes responsables de la DPA. Aunque se sabe que las corrientes con rectificación interna son mayores en la AI que en la AD, los estudios que comparan las corrientes repolarizantes de  $K^+$  voltaje-dependientes entre ambas aurículas son escasos y poco concluyentes. Existen también diferencias electrofisiológicas intra-auriculares, es decir, dentro de la misma aurícula convergen miocitos con distintos patrones de conducción eléctrica. Es también necesario conocer cómo afecta la FA a esta heterogeneidad intra-auricular, ya que no existen estudios en este sentido.



Por otro lado, existen datos que sugieren que la estimulación adrenérgica tiene una profunda influencia en la génesis y en el mantenimiento de la FA. Sin embargo, aun no se ha determinado cómo la estimulación adrenérgica afecta a los mecanismos electrofisiológicos subyacentes a la FA. Datos previos sugieren que la FA crónica está asociada con una potenciación del efecto del ISO sobre la  $I_{CaL}$ . Sin embargo, los efectos de la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos sobre las corrientes repolarizantes de  $K^+$  y sobre las características del PA en miocitos auriculares humanos procedentes de la AI y la AD de pacientes en RS y con FA crónica no han sido comparados aun.

Por todo ello, los **OBJETIVOS** de la presente **TESIS DOCTORAL** fueron:

1. Comparar las corrientes de  $K^+$  voltaje-dependientes en miocitos humanos disociados enzimáticamente a partir de la OAI y la orejuela auricular derecha OAD de pacientes en RS.
2. Determinar el efecto de la FA crónica sobre las corrientes de  $K^+$  voltaje-dependientes, registrándolas en miocitos humanos disociados enzimáticamente a partir de la OAI y la OAD de pacientes con FA crónica, comparando los resultados con los obtenidos en miocitos de pacientes en RS.
3. Determinar los efectos de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre las corrientes de  $K^+$   $I_{to1}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Ks}$  e  $I_{K1}$  y sobre la  $I_{CaL}$ , registrándolas en miocitos humanos disociados enzimáticamente a partir de la OAI y la OAD de pacientes en RS
4. Determinar los efectos de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos en las corrientes de  $K^+$   $I_{to1}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Ks}$ , e  $I_{K1}$  y sobre la  $I_{CaL}$  registrándolas en miocitos humanos disociados enzimáticamente a partir de la OAI y la OAD de pacientes con FA crónica y compararlos con los resultados obtenidos en miocitos de pacientes en RS.
5. Comparar los efectos de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre las características de los PA registrados en miocitos humanos disociados enzimáticamente a partir de la OAD de pacientes en RS y con FA crónica.

### **III. RESULTADOS :**

**1) In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both.**

Caballero R, **de la Fuente MG**, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55(21):2346-54.



QUARTERLY FOCUS ISSUE: HEART RHYTHM DISORDERS

## In Humans, Chronic Atrial Fibrillation Decreases the Transient Outward Current and Ultrarapid Component of the Delayed Rectifier Current Differentially on Each Atria and Increases the Slow Component of the Delayed Rectifier Current in Both

Ricardo Caballero, BPHARM, PhD,\* Marta González de la Fuente, BPHARM,\*  
Ricardo Gómez, BPHARM,\* Adriana Barana, BSCI,\* Irene Amorós, BPHARM,\* Pablo Dolz-Gaitón, BSCI,\*  
Lourdes Osuna,\* Jesús Almendral, MD, PhD,† Felipe Atienza, MD, PhD,†  
Francisco Fernández-Avilés, MD, PhD,† Ana Pita, MD,† Jorge Rodríguez-Roda, MD,†  
Ángel Pinto, MD, PhD,† Juan Tamargo, MD, PhD,\* Eva Delpón, BPHARM, PhD\*  
*Madrid, Spain*

<b>Objectives</b>	The purpose of this study was to compare the voltage-dependent $K^+$ currents of human cells of the right and left atria and determine whether electrical remodeling produced by chronic atrial fibrillation (CAF) is chamber-specific.
<b>Background</b>	Several data point to the existence of interatrial differences in the repolarizing currents. Therefore, it could be possible that CAF-induced electrical remodeling differentially affects voltage-dependent $K^+$ currents in each atrium.
<b>Methods</b>	Currents were recorded using the whole-cell patch-clamp in myocytes from left (LAA) and right atrial appendages (RAA) obtained from sinus rhythm (SR) and CAF patients.
<b>Results</b>	In SR, LAA and RAA myocytes were divided in 3 types, according to their main voltage-dependent repolarizing $K^+$ current. CAF differentially modified the proportion of these 3 types of cells on each atrium. CAF reduced the $Ca^{2+}$ -independent 4-aminopyridine-sensitive component of the transient outward current ( $I_{to1}$ ) more markedly in the LAA than in the RAA. Therefore, an atrial right-to-left $I_{to1}$ gradient was created by CAF. In contrast, the ultrarapid component of the delayed rectifier current ( $I_{Kur}$ ) was more markedly reduced in the RAA than in the LAA, thus abolishing the atrial right-to-left $I_{Kur}$ gradient observed in SR. Importantly, in both atria, CAF increased the slow component of the delayed rectifier current ( $I_{Ks}$ ).
<b>Conclusions</b>	Our results demonstrated that in SR there are intra-atrial heterogeneities in the repolarizing currents. CAF decreases $I_{to1}$ and $I_{Kur}$ differentially in each atrium and increases $I_{Ks}$ in both atria, an effect that further promotes re-entry. (J Am Coll Cardiol 2010;55:2346–54) © 2010 by the American College of Cardiology Foundation

At least 2 types of atrial action potentials (APs) may be recorded in human right atrial (RA) preparations: those with a prominent spike of fast repolarization followed by

a plateau and those without spike and prominent plateau phase (1). More recently, 3 RA cell types were identified on the basis of their outward  $K^+$  repolarizing currents and, consequently, on the morphology of their AP (2). In humans, as in other species, the atrial refractory period (ARP) is shorter in the left atrium (LA) than the RA (3), which points to interatrial differences in the currents underlying the AP. In fact, inward rectifier currents have been shown to be larger in cells from the LA than the RA of animals and humans (4,5). However, studies comparing the voltage-dependent repolarizing currents in the human RA and LA are scarce or absent. A genomic comparison among heart chambers did not find ion channel gene expression differences between RA and LA (6).

From the \*Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; and the †Cardiology and Cardiovascular Surgery Services, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain. Supported by Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC-13), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-04903), Instituto de Salud Carlos III (Red HERACLES RD06/0009 and PI080665), and Fundación LILLY grants. Dr. Atienza has served as a consultant to Medtronic and received research grant support from St. Jude Medical. Drs. Caballero and González de la Fuente contributed equally to this work.

Manuscript received December 4, 2009; revised manuscript received January 28, 2010, accepted February 15, 2010.

Acute atrial fibrillation (AF) and chronic atrial fibrillation (CAF) are characterized by shortening of ARP and AP duration (APD), increased ARP dispersion, and loss of APD adaptation to changes in frequency (7,8). Such alterations in atrial electrical properties (electrical remodeling) are caused by derangements in ion channel expression (7,9). Surprisingly, in all studies thus far, human RA cells were considered identical, and no data were provided on whether electrical remodeling differentially affected diverse RA cell types.

Studies in animal models and humans have demonstrated LA versus RA differences in AF frequency and dynamics, with the LA usually activating at faster rates (4,5,10,11). This is particularly evident in patients with paroxysmal AF (10,11). Assuming that electrical remodeling is a consequence of the fast frequency of activation (9), it is possible that LA remodeling is more marked than RA. However, it is currently unknown whether the electrical remodeling process is chamber specific. Therefore, we studied the distribution of cell types in the right atrial appendages (RAAs) and left atrial appendages (LAAs) of sinus rhythm (SR) patients according to differences in the main voltage-dependent K<sup>+</sup> current. We also determined how CAF modified this distribution in each atrium. Our results demonstrate that in SR there is heterogeneity in the repolarizing currents within each atrium. CAF decreases the Ca<sup>2+</sup>-independent 4-aminopyridine (4-AP)-sensitive component of the transient outward current (I<sub>to1</sub>) and the ultrarapid component of the delayed rectifier (I<sub>Kur</sub>) differentially on each atrium. Furthermore, CAF increases the slow component of the delayed rectifier (I<sub>Ks</sub>) in both. This latter effect may contribute to CAF-induced shortening of APD and to promote re-entry.

## Methods

The study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario Gregorio Marañón (CNIC-13) and conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Each patient gave written informed consent.

Myocytes were enzymatically isolated (12) from RAA and LAA pieces obtained from SR and CAF patients undergoing cardiac surgery (Online Table 1). Currents were recorded using the whole-cell patch-clamp configuration. messenger ribonucleic acid (mRNA) was isolated from human atrial appendages, and semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis (13) was performed using the primers described in Online Table 2.

Results are expressed as mean ± SEM. Unpaired *t* test or 1-way analysis of variance followed by Newman-Keuls test were used to assess statistical significance where appropriate. Comparisons between categorical variables were done using Fisher exact test. A value of *p* < 0.05 was considered significant. An expanded Methods section is available in the Online Appendix.

## Results

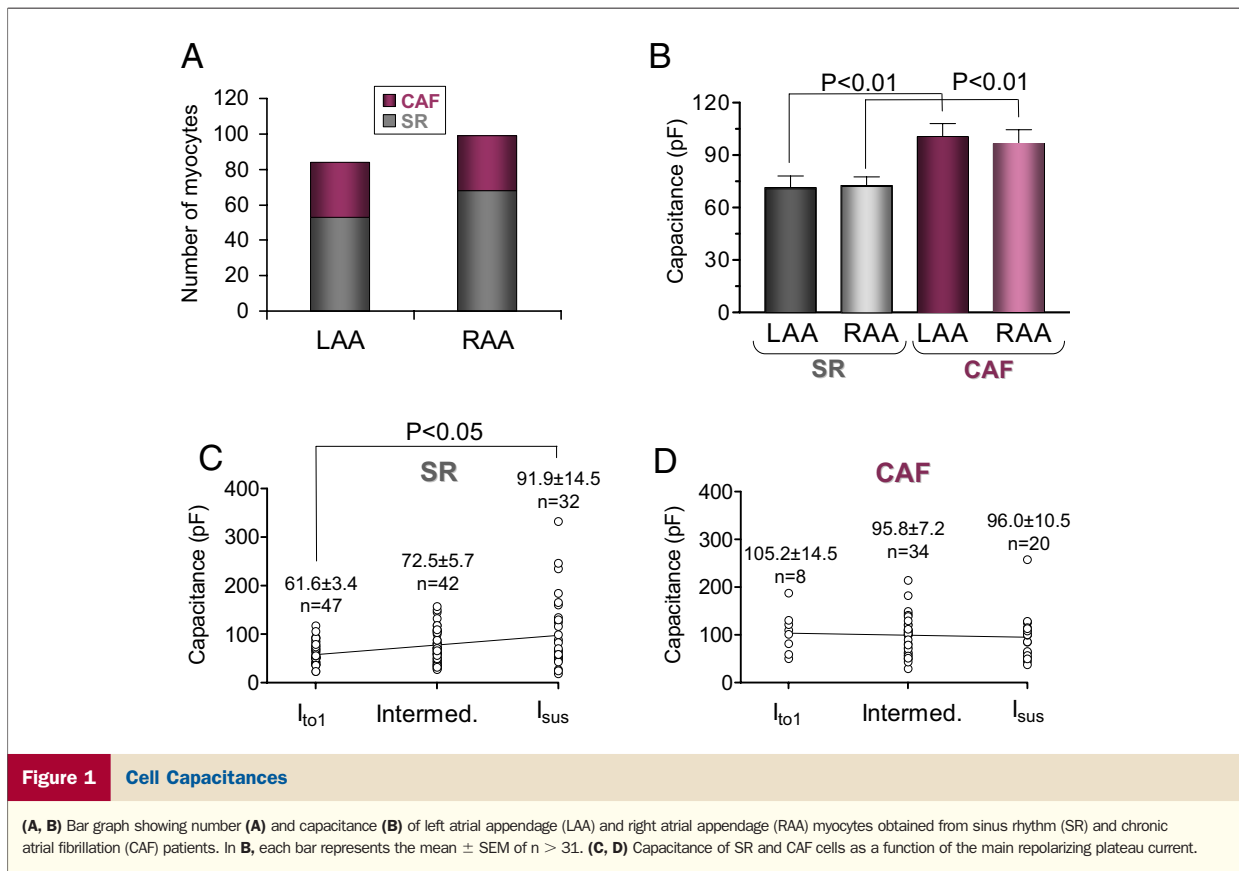
For electrophysiological experiments, we analyzed 22 and 11 samples obtained from patients in SR and CAF, respectively. Figure 1A shows the number of myocytes from the LAA and RAA studied from each group of patients. The mean size of LAA and RAA myocytes from CAF patients was greater than that of myocytes from SR patients as assessed by cell capacitance measurement. However, in both SR and CAF patients, cell capacitance of LAA myocytes was indistinguishable from RAA myocytes (Fig. 1B).

Considering the main K<sup>+</sup> current elicited at plateau potentials, and following standardized criteria (Online Appendix), 3 types of cells can be differentiated (Fig. 2A). Currents were recorded in randomly selected rod-shaped healthy myocytes. Figure 2A shows families of currents elicited by 250-ms pulses from −90 mV to potentials ranging from −90 to +50 mV in 3 representative cells. Approximately 35% of the LAA myocytes from SR patients exhibited an outward current mainly composed of a fast-activating and inactivating component (Fig. 2B). In these cells, the amplitude of the sustained component recorded at the end of the pulse was ~20% of the peak amplitude. Therefore, the main repolarizing current during the plateau phase in these cells was the I<sub>to1</sub> (I<sub>to1</sub>-predominant). I<sub>to1</sub> was completely absent in 20% of cells, in which a fast-activating noninactivating component was recorded (I<sub>sus</sub>-predominant) (Fig. 2A). In I<sub>sus</sub>-predominant cells, the current amplitude at the end of the depolarizing pulses was ~85% of the peak current. Finally, in 45% of LAA cells, an intermediate pattern was detected (i.e., the cells exhibited both an I<sub>to1</sub> and a sustained component that represented >50% of the peak current [intermediate cells]) (Figs. 2A and 2B). Interestingly, in SR the distribution of these cell types in the LAA and the RAA was almost identical (Fig. 2B). Figure 1C shows the capacitance of each cell type in SR samples. In both atria, I<sub>to1</sub>-predominant cells were significantly smaller than I<sub>sus</sub>-predominant cells.

Figure 2C shows the percentage of each myocyte type found in LAA and RAA samples from CAF patients. In the LAA, we detected a significant decrease in the percentage of I<sub>to1</sub>-predominant cells, which was accompanied by an increase in the percentage of cells that exhibited the intermediate pattern. In the RAA, CAF also significantly decreased

### Abbreviations and Acronyms

<b>4-AP</b>	= 4-aminopyridine
<b>AF</b>	= atrial fibrillation
<b>AP</b>	= action potential
<b>APD</b>	= action potential duration
<b>ARP</b>	= atrial refractory period
<b>CAF</b>	= chronic atrial fibrillation
<b>I<sub>Kr</sub></b>	= rapid component of the delayed rectifier current
<b>I<sub>Ks</sub></b>	= slow component of the delayed rectifier current
<b>I<sub>Kur</sub></b>	= ultrarapid component of the delayed rectifier current
<b>I<sub>sus</sub></b>	= fast-activating noninactivating current
<b>I<sub>to1</sub></b>	= Ca <sup>2+</sup> -independent 4-aminopyridine-sensitive component of the transient outward current
<b>LA</b>	= left atrium/atrial
<b>LAA</b>	= left atrial appendage
<b>RA</b>	= right atrium/atrial
<b>RAA</b>	= right atrial appendage
<b>SR</b>	= sinus rhythm



**Figure 1** Cell Capacitances

(A, B) Bar graph showing number (A) and capacitance (B) of left atrial appendage (LAA) and right atrial appendage (RAA) myocytes obtained from sinus rhythm (SR) and chronic atrial fibrillation (CAF) patients. In B, each bar represents the mean ± SEM of  $n > 31$ . (C, D) Capacitance of SR and CAF cells as a function of the main repolarizing plateau current.

the percentage of  $I_{to1}$ -predominant cells, which, in this case, was accompanied by a significant increase in the  $I_{sus}$ -predominant type. Due to these changes, cell types were not equally distributed in the RAA and LAA in CAF patients. Figure 1D demonstrates that differences in cell capacitance among cell types were annulled by CAF in such a way that  $I_{to1}$ -predominant cells were similar in size to the 2 other types.

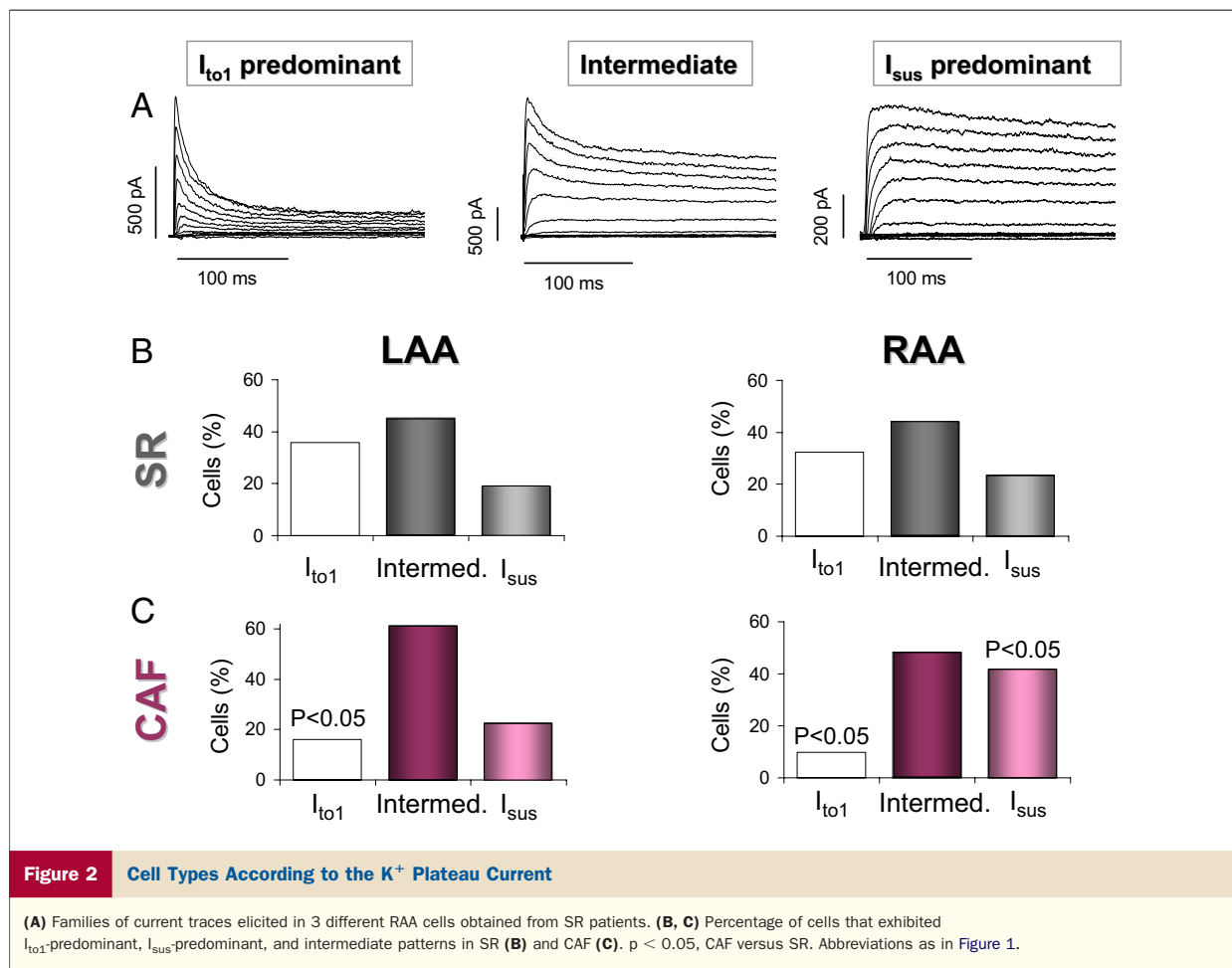
Figures 3A and 3B show the  $I_{to1}$  current-voltage relationships for LAA and RAA myocytes from patients in SR and CAF. In cells with  $I_{to1}$ -predominant and -intermediate patterns,  $I_{to1}$  was measured as the difference between the peak current and the current at the end of the 250-ms pulse. In the RAA, the  $I_{to1}$  amplitude was not statistically different in CAF versus SR patients (Fig. 3B), whereas it was significantly decreased in the LAA at potentials positive to -30 mV (Fig. 3A). Figures 3C and 3D show the  $I_{to1}$  density (calculated by normalizing the current amplitude by the cell capacitance) as a function of the membrane potential. In the RAA, the  $I_{to1}$  density significantly decreased in CAF patients only at potentials  $\geq +20$  mV. In contrast, in the LAA, the  $I_{to1}$  density markedly decreased at potentials  $\geq -20$  mV. CAF did not modify the voltage and time dependence of  $I_{to1}$  inactivation (Online Table 3).

Next, we analyzed the  $I_{to1}$  amplitude and density at +30 mV, a positive membrane potential that can be easily reached under physiological conditions (Fig. 4). CAF sig-

nificantly decreased the  $I_{to1}$  amplitude in LAA cells but not in RAA cells (Fig. 4A), whereas it significantly decreased the  $I_{to1}$  density in both LAA and RAA, the effect being more marked in the former (Fig. 4B). Therefore, CAF established a difference in  $I_{to1}$  amplitude and density between the LAA and RAA.

Figures 5A and 5B show the  $I_{sus}$  current-voltage relationships.  $I_{sus}$  amplitude was measured as the current at the end of the 250-ms pulses. In the LAA,  $I_{sus}$  amplitude was indistinguishable in CAF versus SR patients (Fig. 5A), whereas it was significantly decreased in the RAA at potentials positive to -20 mV (Fig. 5B). However,  $I_{sus}$  density significantly decreased both in LAA and RAA at potentials positive to -10 and -20 mV, respectively (Figs. 5C and 5D). Figure 4 represents the  $I_{sus}$  amplitude (Fig. 4C) and density (Fig. 4D) at +30 mV in LAA and RAA of both patient groups. In SR, both  $I_{sus}$  amplitude and density were significantly greater in RAA than in LAA myocytes. In CAF myocytes,  $I_{sus}$  amplitude significantly decreased only in the RAA, but remained unchanged in the LAA. Probably due to the cell size increase, CAF significantly decreased the  $I_{sus}$  density in both atria. Consequently, in CAF,  $I_{sus}$  density became similar in both atria.

**Components of  $I_{sus}$ .** The next goal was to identify the current/currents that underlie  $I_{sus}$  in RAA and LAA of both SR and CAF patients using a pharmacological

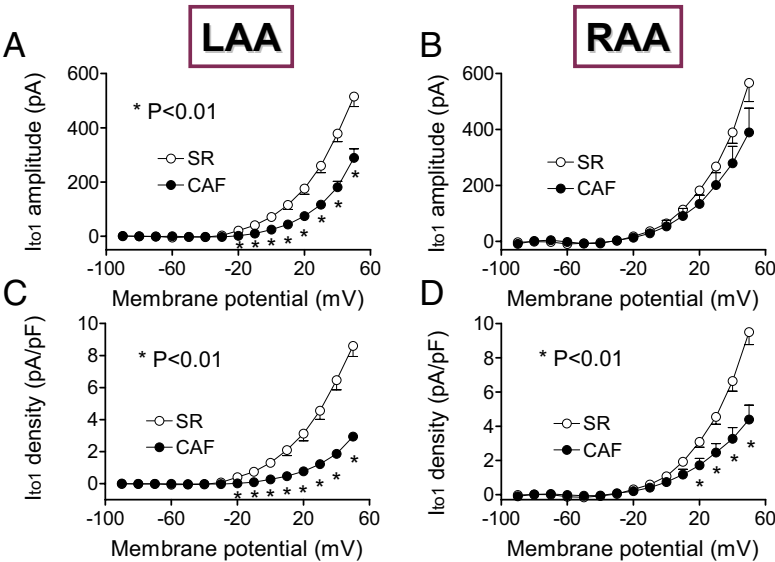


strategy. Figure 6A shows the outward current recorded in an RAA cell obtained from an SR patient with an intermediate pattern in control conditions and after perfusion with 1  $\mu$ mol/l of dofetilide, a specific blocker of the rapid component of the delayed rectifier current ( $I_{Kr}$ ) (14). The  $I_{Kr}$  amplitude, measured as the dofetilide-sensitive current obtained by digital subtraction, was extremely small. Identical results were obtained in LAA cells. Furthermore,  $I_{Kr}$  amplitude was not modified in CAF patients, which confirms previous data (15). Thereafter, the cell was perfused with 4-AP at 50  $\mu$ mol/l, which selectively blocks the  $I_{Kur}$  generated by Kv1.5 channels (14,16). Figure 6A shows that the amplitude of the  $I_{Kur}$  at the end of the pulse accounts for  $\geq 70\%$  of the amplitude of the  $I_{sus}$  described so far. Finally, the cell was perfused with 4-AP at 2 mmol/l, a concentration that blocks  $I_{to1}$  (14). As shown in Figure 6A, the remaining current after 4-AP treatment was small, and the morphology of the 2 mmol/l 4-AP-sensitive current coincided with  $I_{to1}$  (i.e., fast activation and inactivation). It is noteworthy that the  $I_{to1}$  amplitude at the end of the +50-mV pulse was very small. Figure 6C shows the amplitude of the  $I_{sus}$  component measured at the end of

250-ms pulses to +50 mV in LAA and RAA cells from SR patients. Consistent with Figure 5, the  $I_{sus}$  amplitude was significantly greater in the RAA than in the LAA. Solid bars represent the amplitude of the 2 mmol/l 4-AP-sensitive component, which at the end of the pulse mainly represents  $I_{Kur}$ , because as demonstrated in the previous text the amplitudes of both  $I_{Kr}$  and  $I_{to1}$  at the end of the pulses were negligible. The results demonstrated that the  $I_{Kur}$  was significantly greater in the RAA than in the LAA (Fig. 6C).

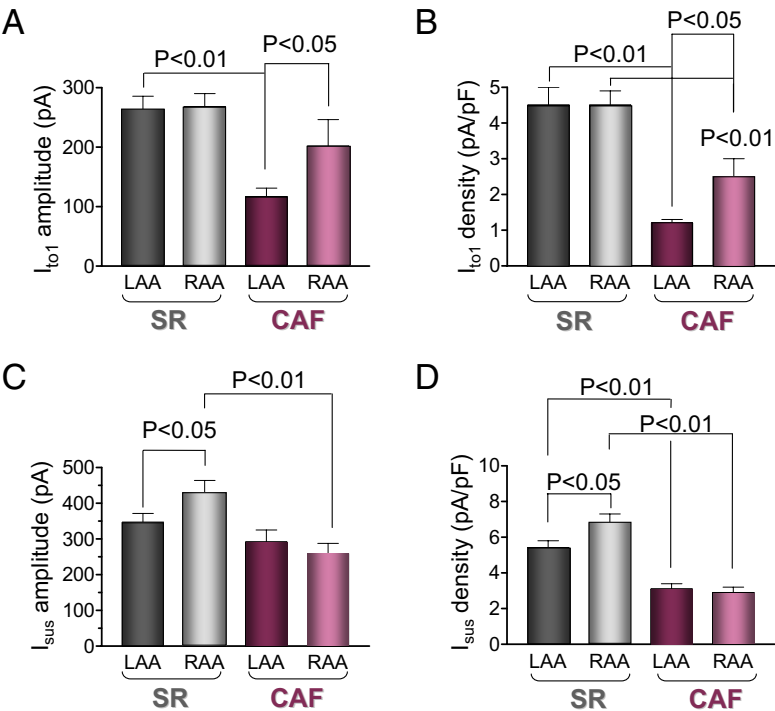
Figure 6B shows the current elicited in an intermediate pattern cell from the RAA of a CAF patient in the presence and absence of 2 mmol/l of 4-AP. The 2 mmol/l 4-AP-sensitive current was composed of  $I_{to1}$  and  $I_{Kur}$ , and its amplitude at the end of the pulse reflected the  $I_{Kur}$  amplitude. Figure 6C confirms that CAF reduced  $I_{sus}$  and demonstrates that  $I_{Kur}$  significantly decreased only in the RAA.

**The 4-AP-resistant component.** Figures 7A and B show families of traces of 2 mmol/l of 4-AP-resistant current recorded in RAA cells from SR and CAF patients, respectively, by applying the protocol shown at the top. Figure 7C represents the current-voltage relationships obtained by plotting the 2 mmol/l of 4-AP-resistant current amplitude



**Figure 3**  $I_{to1}$  Amplitude and Density

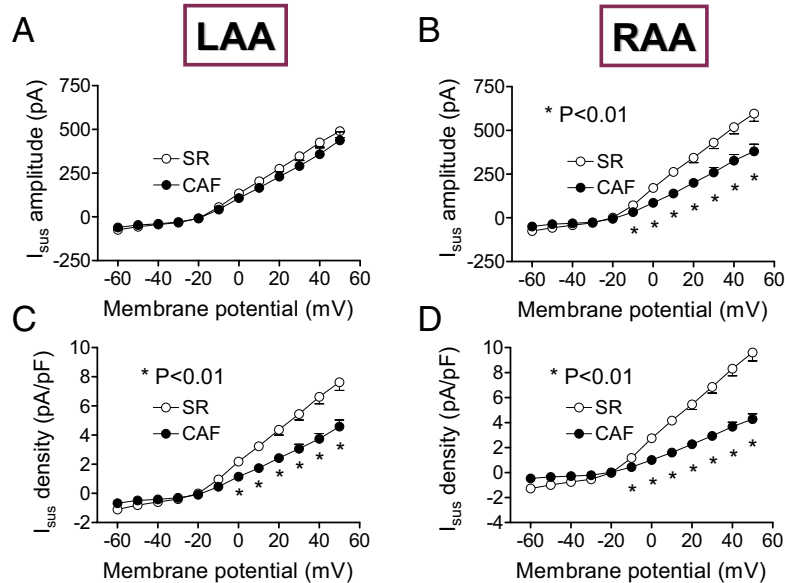
Mean current (A, B) and current density (C, D) voltage relationships for  $I_{to1}$  in LAA (A, C) and RAA (B, D) myocytes from SR and CAF patients. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of  $n > 24$ . \* $p < 0.01$ , CAF versus SR. Abbreviations as in Figure 1.



**Figure 4**  $I_{to1}$  and  $I_{sus}$  Amplitude and Density at +30 mV

$I_{to1}$  amplitude (A) and density (B) at +30 mV in LAA and RAA myocytes from SR and CAF patients.  $I_{sus}$  amplitude (C) and density (D) at +30 mV in LAA and RAA myocytes from SR and CAF patients. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of  $n > 24$ . Abbreviations as in Figure 1.





**Figure 5**  $I_{sus}$  Amplitude and Density

Mean current (A, B) and current density (C, D) voltage relationships for  $I_{sus}$  recorded in LAA (A, C) and RAA (B, D) myocytes obtained from SR and CAF patients. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of  $n > 31$ . \* $p < 0.01$ , CAF versus SR. Abbreviations as in Figure 1.

(measured as the difference between the amplitude at the end and the beginning of the pulse) as a function of the test voltage in the LAA and RAA. At voltages positive to +20 mV, the 4-AP-resistant component was significantly greater in CAF than in SR cells, and this increase was observed in both atria. This current was generated by a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel because it was blocked by 10 mmol/l of tetraethylammonium (not shown). Furthermore, it activated with very slow kinetics, even at positive potentials (note that the depolarizing pulses were 4 s in duration). An envelope-of-tail test confirmed that the current was generated by a single population of channels because the  $I_{Ktail}/I_{Kmax}$  ratio was constant at  $0.27 \pm 0.05$ , regardless of the duration of the pulse (Online Fig. 1). Finally, Figure 7D demonstrates that the current was blocked by HMR-1556 (1  $\mu$ mol/l), an  $I_{Ks}$ -selective blocker (14). Overall these results suggest that CAF significantly increased the amplitude of  $I_{Ks}$  in both atria, an effect that overcame the cell size increase, thus producing an increase in the  $I_{Ks}$  density (Fig. 7E).

**mRNA remodeling.** Preliminary analysis of transcriptional changes were determined by comparing gene-of-interest/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein kinase C  $\alpha$  ratios between SR and CAF samples (Online Appendix). CAF reduced Kv4.3, whereas it did not significantly modify Kv1.5 mRNA levels (Online Fig. 2). Furthermore, CAF slightly decreased Kv7.1 (KvLQT1, the  $\alpha$  subunit of Ks channels) mRNA level (Online Fig. 3); the effect was identical in LAA and RAA samples (not shown). In contrast, minK mRNA was detected in all CAF samples, whereas it was

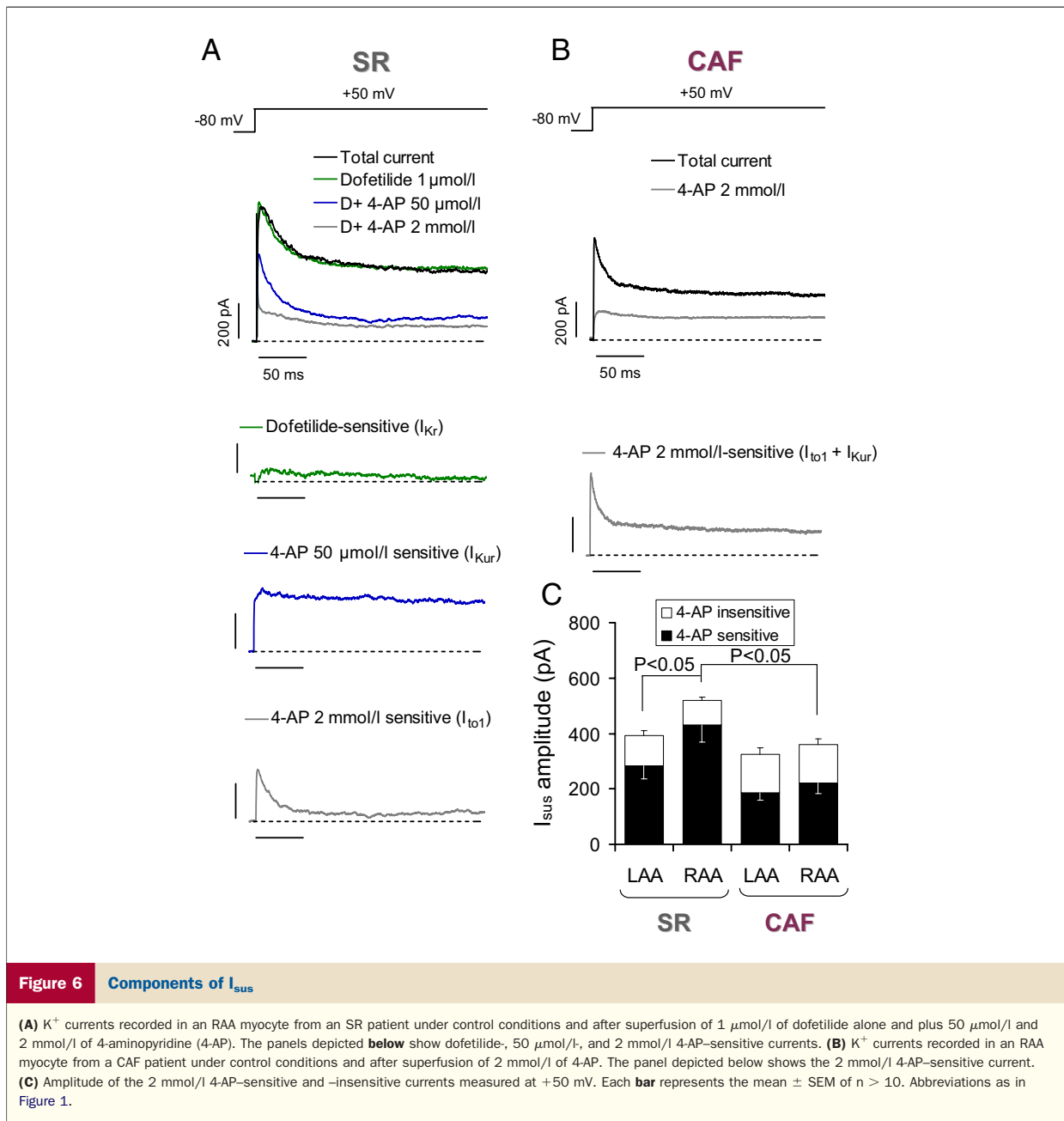
only detected in 2 of 4 SR samples. Therefore, CAF significantly increased minK expression (Fig. 7F).

## Discussion

Our results demonstrated that CAF reduced the  $I_{to1}$  amplitude and density more markedly in the LAA than in the RAA. On the contrary,  $I_{Kur}$  was more markedly reduced in the RAA than in the LAA. In both atria, CAF increased the  $I_{Ks}$  amplitude and density. Altogether, these changes reveal that CAF promotes interatrial differences in repolarizing currents.

**Effects of CAF on the heterogeneity in the K<sup>+</sup> plateau repolarizing currents.** Our results demonstrated that myocytes of both atria from patients in SR are electrically heterogeneous. The majority of cells exhibited an intermediate pattern with simultaneous presence of  $I_{to1}$  and  $I_{sus}$ . Such heterogeneity was also accompanied by cell size differences (i.e.,  $I_{to1}$ -predominant cells were smaller than  $I_{sus}$ -predominant cells). Furthermore, differences in the repolarizing currents must be reflected on the morphology of their corresponding APs, as demonstrated in the RAA (2). Importantly, in SR, the distribution of the 3 types of cells was identical in both atria.

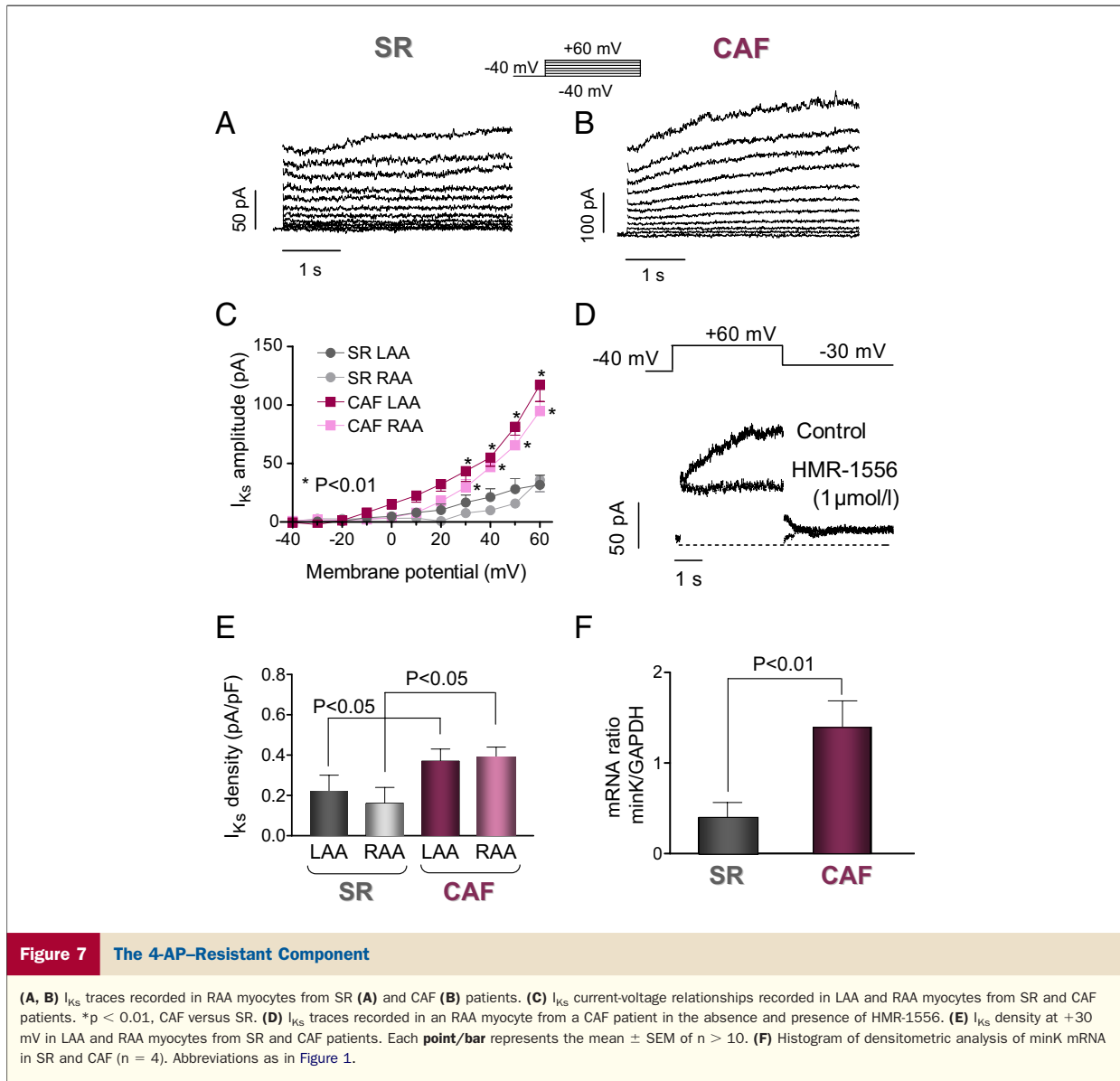
Interestingly, CAF-induced electrical remodeling reduces the RA-to-LA resemblance. In both atria, the percentage of decrease of  $I_{to1}$ -predominant cells was similar. However, such reduction was accompanied by an increase in the percentage of intermediate cells in the LAA, but by an increase of  $I_{sus}$ -predominant cells in the



RAA. Furthermore, CAF promoted a more marked decrease in  $I_{to1}$  amplitude and density in the LAA than in the RAA, which results in a greater density of  $I_{to1}$  in the RAA. Therefore, an RAA-to-LAA  $I_{to1}$  density gradient was created by CAF. Conversely, because  $I_{sus}$  amplitude and density were decreased more markedly in the RAA than in the LAA, the physiological RAA-to-LAA  $I_{sus}$  gradient was annulated by CAF. Therefore, it can be concluded that CAF increases the interatrial dissimilarity in repolarizing currents.

**Which atrium is the most affected by CAF?** Experimental and clinical studies demonstrated that, particularly during

paroxysmal AF, the LA experiences faster rates than the RA (4,10). Assuming that electrical remodeling is a consequence of the fast atrial frequency of activation (9), our initial hypothesis was that if remodeling had to be more marked in one atrium than in the other, then the most affected would be the LA. Our results suggest that both atria are profoundly affected, but in different ways. This striking result suggests that other factors besides the increase of the activation frequency produce electrical remodeling. However, it should be stressed that myocytes used in this study came from CAF patients in whom LA frequencies could not be higher than RA frequencies.



**CAF increases  $I_{Ks}$ .** A novel and relevant result of this study is that, in both atria, CAF increases the amplitude and density of a 4-AP-resistant tetraethylammonium-sensitive component. The envelope-of-tail test demonstrated that this current was composed of a single time-dependent outward current that was sensitive to HMR-1556. These features, together with the positive midpoint of the activation curve ( $V_h = 7.6 \pm 1.2$  mV) and the slow activation kinetics ( $\tau_{act} = 2.2 \pm 0.1$  s at +60 mV), strongly suggest that the increased current was  $I_{Ks}$ . This result merits several considerations. This is the first demonstration of a CAF-induced increase of a voltage-dependent K<sup>+</sup> current. Indeed, so far only a CAF-induced increase in voltage-independent inward rectifier currents (the  $I_{K1}$  and the agonist-independent component of the  $I_{KACh}$ ) has been

described (9,15,17). The increase in these inward rectifier currents seems to play a critical role in shortening the atrial APD and ARP and in promoting AF maintenance and recurrence (18). Because  $I_{Ks}$  accumulates at high frequencies due to its slow deactivation, the  $I_{Ks}$  increase would also contribute to CAF-induced shortening of APD and to further promote fibrillatory conduction (19). It is reasonable to speculate that a frequency-dependent inhibition of  $I_{Ks}$ , such as that produced by propafenone (20), is useful in the CAF context, thus converting  $I_{Ks}$  in a putative antiarrhythmic target (19).

**Comparison with previous reports.** Our results on  $I_{to1}$  and  $I_{Kur}$  agree with those of previous reports. A strong reduction of  $I_{to1}$ , which was attributed to a decrease in Kv4.3 mRNA level and protein expression, is a consistent finding in patients with CAF (9,15,13,21,22). Further-

more, an  $I_{\text{sus}}$  decrease, which was attributed to a CAF-induced proteolysis that diminishes the Kv1.5 protein expression without modifying the mRNA level, has also been described (13,15,21). Finally, it is noteworthy to stress that this is the first electrophysiological report on human atrial  $I_{\text{Ks}}$  remodeling. Reported alterations in Kv7.1 and minK expression have been variable, with both increases and decreases (9,13,23). Our results agree with those demonstrating a simultaneous decrease in Kv7.1 and increase in minK (23).

**Study limitations.** All samples came from the atrial appendages that could not be representative of the rest of the atria. Furthermore, ionic channel remodeling may be influenced by pharmacological treatment, sex, and/or underlying cardiac diseases of the patients (9). In the SR group, the proportion of patients with valvular and valvular combined with ischemic heart disease was 21 of 26 patients, whereas it was 13 of 15 patients in the CAF group. Thus, the changes described herein could be attributed to the AF itself, because the underlying heart disease was distributed similarly in the SR and CAF groups.

## Conclusions

We demonstrate that in SR there is intra-atrial heterogeneity in the repolarizing currents. CAF profoundly, but differentially, affects the voltage-dependent repolarizing currents in both atria, which promotes interatrial differences. Finally, as to our knowledge, this is the first electrophysiological demonstration of CAF-induced  $I_{\text{Ks}}$  increase, which could be critical in CAF-induced shortening of APD and promotion of fibrillatory activity.

## Acknowledgement

The authors thank Dr. José Jalife for his useful criticisms.

**Reprint requests and correspondence:** Dr. Eva Delpón, Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail: edelpon@med.ucm.es.

## REFERENCES

1. Gelband H, Bush HL, Rosen MR, Myerburg RJ, Hoffman BF. Electrophysiologic properties of isolated preparations of human atrial myocardium. *Circ Res* 1972;30:293–300.
2. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Delayed rectifier outward current and repolarization in human atrial myocytes. *Circ Res* 1993;73:276–85.
3. Papageorgiou P, Monahan K, Boyle NG, et al. Site-dependent intra-atrial conduction delay. Relationship to initiation of atrial fibrillation. *Circulation* 1996;94:384–9.
4. Sarmast F, Kolli A, Zaitsev A, et al. Cholinergic atrial fibrillation:  $I_{\text{K,ACh}}$  gradients determine unequal left/right atrial frequencies and rotor dynamics. *Cardiovasc Res* 2003;59:863–73.
5. Swartz MF, Fink GW, Lutz CJ, et al. Left versus right atrial difference in dominant frequency, K<sup>+</sup> channel transcripts, and fibrosis in patients

- developing atrial fibrillation after cardiac surgery. *Heart Rhythm* 2009;6:1415–22.
6. Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, et al. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007;582:675–93.
7. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:62–73.
8. Kourliouros A, Savelieva I, Kiotsekoglou A, Jahangiri M, Camm J. Current concepts in the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2009;157:243–52.
9. Michael G, Xiao L, Qi XY, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2009;81:491–9.
10. Sanders P, Berenfeld O, Hocini M, et al. Spectral analysis identifies sites of high-frequency activity maintaining atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2005;112:789–97.
11. Atienza F, Almendral J, Jalife J, et al. Real-time dominant frequency mapping and ablation of dominant frequency sites in atrial fibrillation with left-to-right frequency gradients predicts long-term maintenance of sinus rhythm. *Heart Rhythm* 2009;6:33–40.
12. Gómez R, Caballero R, Barana A, et al. Nitric oxide increases cardiac  $I_{\text{K1}}$  by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009;105:383–92.
13. Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, et al. Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation* 2001;103:684–90.
14. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;62:9–33.
15. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;44:121–31.
16. Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997;80:572–9.
17. Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, et al. The G protein-gated potassium current  $I_{\text{K,ACh}}$  is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005;112:3697–706.
18. Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current  $I_{\text{K1}}$  controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005;2:316–24.
19. Muñoz V, Grzeda KR, Desplantez T, et al. Adenoviral expression of  $I_{\text{Ks}}$  contributes to wavebreak and fibrillatory conduction in neonatal rat ventricular cardiomyocyte monolayers. *Circ Res* 2007;101:475–83.
20. Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995;76:223–35.
21. Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;80:772–81.
22. Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2001;52:226–35.
23. Lai LP, Su MJ, Lin JL, et al. Changes in the mRNA levels of delayed rectifier potassium channels in human atrial fibrillation. *Cardiology* 1999;92:248–55.

**Key Words:** chronic atrial fibrillation ■ voltage-dependent potassium channels ■ electrical remodeling ■ human myocytes ■ slow delayed rectifier.

## APPENDIX

For an expanded Methods section, supplementary figures, and supplementary tables, please see the online version of this article.



## **Online Appendix for the following *JACC* article**

**TITLE:** In Humans, Chronic Atrial Fibrillation Decreases the Transient Outward Current and Ultrarapid Component of the Delayed Rectifier Current Differentially on Each Atria and Increases the Slow Component of the Delayed Rectifier Current in Both

**AUTHORS:** Ricardo Caballero, Marta González de la Fuente, Ricardo Gómez, Adriana Barana, Irene Amorós, Pablo Dolz-Gaitón, Lourdes Osuna, Jesús Almendral, Felipe Atienza, Francisco Fernández-Avilés, Ana Pita, Jorge Rodríguez-Roda, Ángel Pinto, Juan Tamargo, Eva Delpón

---

## **APPENDIX**

### **Expanded Material and Methods**

#### **Patients and atrial appendage collection**

The study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario Gregorio Marañón (CNIC-13) and conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Each patient gave written informed consent. Right (RAA) and left atrial appendage (LAA) samples were obtained from patients in sinus rhythm (SR) and with chronic atrial fibrillation (CAF) that underwent cardiac surgery. Patient history was used to collect several clinical data, including echocardiographic data and type and duration of the arrhythmia where appropriate. All the patients included in the atrial

fibrillation group were in CAF (>6 month at the time of surgery). Pharmacological treatment and stage of heart failure (according to the New York Heart Association [NYHA] classification) were also determined. All these clinical data are summarized in the online Table 1.

## **Electrophysiological analysis**

### **Human atrial myocyte isolation**

Atrial myocytes were enzymatically isolated from RAA and LAA samples obtained from 22 patients in SR and from 11 patients with CAF following methods previously described (1,2). Immediately after surgical excision, samples were placed into chilled  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode's solution containing (mM): NaCl 100, KCl 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  5, taurine 50, MOPS 5, and glucose 20 (pH 7.0 with NaOH) and supplemented with 2,3-butanedione monoxime (BDM, 30 mM), chopped into small pieces ( $\approx 1 \text{ mm}^3$ ), and washed 3 times for 3 minutes with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Tyrode's solution. Tissue pieces were then changed to  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution containing 254 U/mL collagenase type I (Worthington, USA) and 0.5 mg/mL protease type XXIV (Sigma Chemical Co, United Kingdom) and gently stirred for 15 minutes. Afterwards, the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was raised to 0.2 mM, and the tissue was stirred for 30 minutes more. Stirring was continued with Tyrode's solution (0.2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) containing only collagenase until rod-shaped striated myocytes were seen ( $\approx 35$  minutes). During all these steps, the solutions were continuously oxygenated with 100%  $\text{O}_2$  at 37°C.

Myocytes were kept until use in a storage solution containing (mM): KCl 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10, glucose 10, K-glutamate 70,  $\beta$ -hydroxybutyrate 10, taurine 10, EGTA 10, and albumin 1 (pH 7.4 with KOH). Myocytes were used for electrophysiological recordings within 8 h.

## Recording techniques

A small aliquot of cell suspension was placed in a 0.5 mL chamber mounted on the stage of an inverted microscope (Nikon TMS, Nikon Co., Japan). After settling to the bottom of the chamber, cells were perfused at 1 mL/min with external solution (see composition below). Currents were recorded at room temperature (21-23°C) using the whole cell patch-clamp technique using an Axopatch-200B patch clamp amplifier (Molecular Devices, USA). (1-6). Recording pipettes were pulled from 1.0 mm o.d. borosilicate capillary tubes (GD1, Narishige Co., Ltd, Japan) using a programmable patch micropipette puller (Model P-2000 Brown-Flaming, Sutter Instruments Co., USA) and were heat-polished with a microforge (Model MF-830, Narishige). Micropipette resistance was  $<3.5\text{ M}\Omega$  when filled with the internal solution and immersed in the external solution. The capacitive transients elicited by symmetrical 10 mV steps from 0 mV were recorded at 50 kHz (filtered at 10 kHz) for subsequent calculation of capacitance surface area, access resistance and input impedance. In all the experiments, series resistance was compensated manually by using the series resistance compensation unit of the Axopatch amplifier, and usually  $\geq 80\%$  compensation was achieved. In myocytes from SR patients, mean peak maximum outward  $\text{K}^+$  current amplitude at +50 mV, uncompensated access resistance, and capacitance averaged  $1008.5 \pm 44.3\text{ pA}$ ,  $3.2 \pm 0.4\text{ M}\Omega$ , and  $72.3 \pm 4.0\text{ pF}$  ( $n=121$ ), respectively. In myocytes from CAF patients, mean peak maximum outward  $\text{K}^+$  current amplitude at +50 mV, uncompensated access resistance, and capacitance averaged  $691.5 \pm 50.1\text{ pA}$  ( $P < 0.001$  vs. SR),  $2.9 \pm 0.6\text{ M}\Omega$  ( $P > 0.05$  vs. SR), and  $98.5 \pm 5.5\text{ pF}$  ( $n=62$ ) ( $P < 0.001$  vs. SR), respectively. Thus, under our experimental conditions no significant voltage errors ( $<5\text{ mV}$ ) due to series resistance were expected with the micropipettes used. The current recordings were



sampled at 4 kHz, filtered at half the sampling frequency and stored on the hard disk of a computer for subsequent analysis. To record human atrial outward  $K^+$  currents, the external solution contained (mM): NaCl 140, KCl 4,  $CaCl_2$  1,  $MgCl_2$  1, HEPES 10, glucose 10, nifedipine (1  $\mu M$ ), and atropine (1  $\mu M$ ) (pH 7.4 with NaOH). Recording pipettes were filled with an internal solution containing (mM): K-aspartate 80, KCl 42,  $KH_2PO_4$  10, MgATP 5, phosphocreatine 3, HEPES 5, and EGTA 5 (pH 7.2 with KOH).

### **Pulse protocols and analysis**

The protocol to obtain current-voltage relationships of human atrial outward  $K^+$  currents consisted of 250 ms steps from -80 mV to potentials ranging -90 mV and +50 mV (1). A prepulse of 25 ms to -40 mV was applied to inactivate the inward  $Na^+$  current ( $I_{Na}$ ). The  $Ca^{2+}$ -independent 4-aminopyridine-sensitive component of the transient outward current ( $I_{to1}$ ) was measured, in cells with the  $I_{to1}$ -predominant and intermediate patterns, as the difference between the peak outward current and the current at the end of the voltage step, whereas the fast activating non-inactivating component ( $I_{sus}$ ) was measured as the current at the end of the voltage step (1,7,8). Considering the main  $K^+$  current elicited at plateau potentials, three types of cells can be differentiated. Those cells in which the amplitude of  $I_{sus}$  was  $\leq 20\%$  of the total peak amplitude were designated as  $I_{to1}$ -predominant cells. Those cells in which the  $I_{to1}$  was absent and, therefore, the amplitude of  $I_{sus}$  was  $\geq 85\%$  of the total peak amplitude were designated as  $I_{sus}$ -predominant cells. Finally, cells exhibiting both  $I_{to1}$  and  $I_{sus}$  and, in which the  $I_{sus}$  represented  $>50\%$  of the total peak current, were designated as “intermediate” cells. To obtain the inactivation curves of  $I_{to1}$  a two-step protocol was used. The first 250-ms conditioning pulse from -80 mV to potentials between -90 and +50 mV was followed by a test pulse to +50 mV. Inactivation curves were constructed by plotting the current

amplitude obtained with the test pulse, as a function of the voltage command of the conditioning pulse and a Boltzmann function was fitted to the data to obtain the midpoint ( $V_h$ ) and the slope ( $k$ ) of the inactivation curve. To describe the time course of current decay, an exponential analysis was used. The slow component of the delayed rectifier current ( $I_{Ks}$ ) was recorded by applying 4-s pulses from a holding potential of -40 mV to potentials ranging -40 and +60 mV and tail currents were elicited upon repolarization to -30 mV (9). Under these conditions,  $I_{Ks}$  amplitude was measured as the difference between the instantaneous current level after the decay of the capacity transient and the current level at the end of the voltage step. The activation kinetics of  $I_{Ks}$  has been described as a sigmoidal process, assuming that the channel has multiple closed states (9). However, in the present study and in order to describe the dominant time constant of this process, an exponential analysis was used as an operational approach, fitting the latter part of the activating current with a single exponential of the form:

$$y = A \exp(-t/\tau) + C$$

where  $\tau$  is the system time constant,  $A$  is the amplitude of the exponential and  $C$  is the baseline value.

A Boltzmann equation was fitted to the  $I_{Ks}$  activation curves using a least-squares fitting routine:

$$y = A / \{1 + \exp [(V_h - V_m)/k]\}$$

where  $V_h$  is the midpoint of the activation,  $V_m$  is the test potential, and  $k$  represents the slope factor of the curve.

An envelope-of-tails-test was also performed by applying test pulses from a holding potential of -40 mV to +50 mV for durations ranging from 0.1 to 3 s followed by repolarization to -30 mV. The ratio between the amplitude of the tail currents ( $I_{Ktail}$ ) and

amplitude of the time-dependent current recorded with the depolarizing pulse ( $I_{Kmax}$ ) was plotted as a function of the pulse duration. In some experiments the ultrarapid component of the delayed rectifier current ( $I_{Kur}$ ),  $I_{to1}$ , the rapid component of the delayed rectifier current ( $I_{Kr}$ ) and  $I_{Ks}$  were measured as the current sensitive to 50  $\mu$ M, 2 mM 4-aminopyridine (4-AP), 1  $\mu$ M dofetilide and 10 mM tetraethylammonium, respectively. In those experiments where 2 mM 4-AP was perfused directly after the control recordings (without previous perfusion with 50  $\mu$ M 4-AP), the 2 mM 4-AP sensitive current was composed of  $I_{to1}+I_{Kur}$ .

## **Drugs**

Atropine, 4-AP, tetraethylammonium chloride, and nifedipine were purchased from Sigma, whereas dofetilide and HMR-1556 were kindly provided by Pfizer (United Kingdom) and sanofi-aventis (France), respectively. All these compounds were dissolved as appropriate to yield 0.01 M stock solutions. Further dilutions were carried out in external solution to obtain the desired final concentration. Control solutions always contained the same solvent concentrations as the test solution.

## **Analysis of the mRNA expression of $K^+$ channels**

### **Tissue and RNA preparation**

Total RNA was isolated from human atrial appendages obtained from 4 patients in SR and from 4 patients with CAF. Immediately after the surgical excision, tissue samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further processing. Total RNA was purified from the homogenized tissue specimens (homogenizer Ultra Turrax T18 IKA, Germany) with RNeasy midi kit (Qiagen, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified by photometry ( $\lambda = 260$  nm) and the

purity of the samples was verified by the 260/280 ratio by Nano-Drop 2000 (Thermo Scientific, USA).

### **Semiquantitative polymerase chain reaction analyses**

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using the One-step RT-PCR kit (Qiagen) (6). Target gene specific oligonucleotide primer pairs (forward and reverse) were designed for Kv4.3, Kv1.5, Kv7.1 (KvLQT1), minK, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and protein kinase C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) gene sequences obtained from GenBank DNA sequences database (Online Table 2). Primers were synthesized by Roche Diagnostics *via* TIB-MOLBIOL (Germany) and supplied in lyophilised form. The melting temperature ( $T_m$ ) for each primer target gene used in the PCR reactions is indicated in the online Table 2. RT-PCR was performed on 0.5  $\mu$ g of total RNA and the reactions were repeated at least 3 times for each sample. RT-PCR reaction was performed using the thermocycler *Mastercycler pro* (Eppendorf, Germany) using the following thermal cycler conditions: one step for reverse transcription (50°C 30 min) and initial PCR activation step (95°C 15 min). For Kv4.3, Kv1.5 and Kv7.1 amplification involved 40 cycles of 1 min of DNA denaturalization at 94°C, 1 min of primer annealing (at optimised annealing temperature, online Table 2) and 1 min of primer elongation at 72°C. For minK amplification involved 50 cycles of 1 min of DNA denaturalization at 94°C, 1 min of primer annealing (at optimised annealing temperature, online Table 2) and 1.5 min of primer elongation at 72°C. The final extension step was performed for 10 min at 72°C. The amplification products were run on 1.8% agarose gel containing ethidium bromide (0.5 ng/mL) and visualized under UV light. Molecular weight markers (Sigma) were added to one lane in order to estimate the size of the amplification products. A semi-quantitative analysis of the

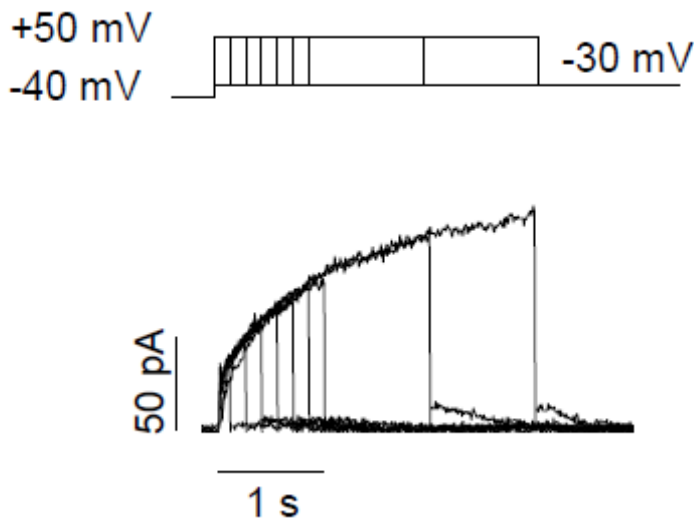
relative expression of the K<sup>+</sup> channel was performed by using the housekeeping gene GAPDH as internal standard. None of the K<sup>+</sup> channel-specific primers cross-reacted with the GAPDH primer after 40 cycles of PCR, with the exception of Kv7.1. Thus, PKC $\alpha$  was used as an internal standard when the expression of Kv7.1 channels was determined. Previous studies described that GAPDH and PKC $\alpha$  expression was not significantly different between atrial samples from SR and CAF patients (10,11). The density of the PCR products was quantified by densitometry (Gel Logic 1500 imaging system, Kodak, USA) and the results obtained were normalized to the internal standard expression.

### **Statistical methods**

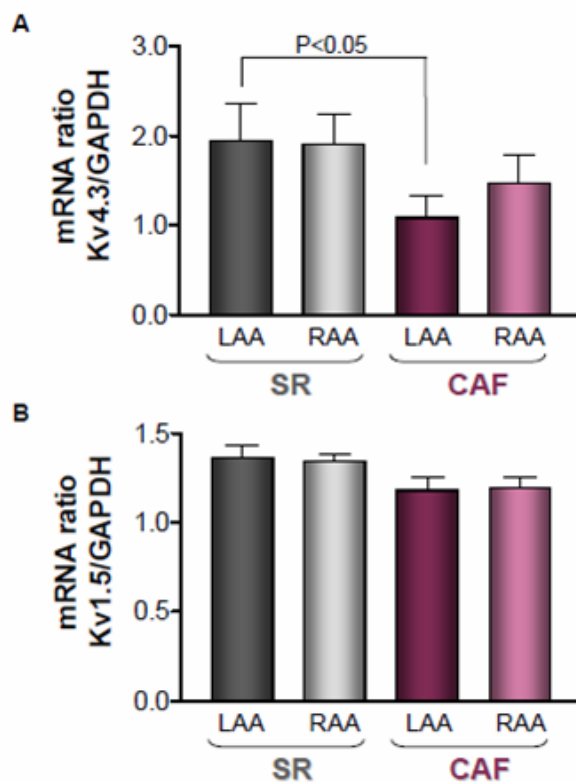
Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Unpaired *t*-test or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test were used to assess statistical significance where appropriate. Comparisons made between categorical variables were done using Fisher's exact test. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## Expanded results

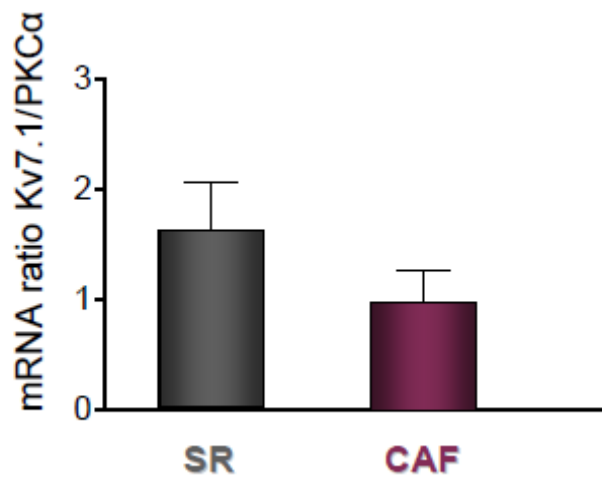
**Online Figure 1.** Current traces showing the envelope-of-tails test for  $I_{Ks}$  recorded in an RAA myocyte from a CAF patient are shown. The protocol consisted of test pulses from a holding potential of -40 mV to +50 mV for durations ranging from 0.1 to 3 s followed by repolarization to -30 mV. The ratio between the amplitude of the tail currents ( $I_{Ktail}$ ) and the amplitude of the time-dependent current recorded with the depolarizing pulse ( $I_{Kmax}$ ) was plotted as a function of the pulse duration. The results obtained with this protocol confirmed that the current recorded was generated by a single population of channels since the  $I_{Ktail}/I_{Kmax}$  ratio was constant at  $0.27 \pm 0.05$ , regardless of the duration of the pulse.



**Online Figure 2.** Histograms of the densitometric analysis of Kv4.3 (A) and Kv1.5 (B) mRNA measured in LAA and RAA from patients in SR and CAF. The results depicted are normalized to the housekeeping gene GAPDH expression. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 4 patients. In SR there were not differences in the Kv4.3 expression between LAA and RAA. CAF decreased the expression of the channel more markedly in the LAA than in the RAA. In SR, Kv1.5 expression was not different in the LAA and in the RAA. Furthermore, CAF did not modify this expression in any of the atria.



**Online Figure 3.** Histograms of the densitometric analysis of Kv7.1 mRNA measured in atrial appendages from patients in SR and CAF. The results depicted are normalized to PKC $\alpha$  expression. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 4 patients. CAF slightly decreased Kv7.1 mRNA level, the effect being identical in LAA and RAA samples.





## References

1. Gómez R, Núñez L, Vaquero M, et al. Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current  $I_{to1}$ . *Cardiovasc Res* 2008;80:375-84.
2. Gómez R, Caballero R, Barana A, et al. Nitric oxide increases cardiac  $I_{K1}$  by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009;105:383-92.
3. Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, et al. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:209-18.
4. Radicke S, Vaquero M, Caballero R, et al. Effects of MiRP1 and DPP6 beta-subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008;154:774-86.
5. Amorós I, Barana A, Caballero R, et al. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:201-10.
6. Barana A, Amorós I, Caballero R, et al. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc Res* 2010;85:56-67.
7. Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward  $K^+$  current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;80:772-81.
8. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;44:121-31.
9. Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier  $K^+$  current in guinea pig

ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995;76:223-35.

10. Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, et al. Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K<sup>+</sup> channels. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:926-32.
11. Voigt N, Friedrich A, Bock M, et al. Differential phosphorylation-dependent regulation of constitutively active and muscarinic receptor-activated I<sub>K,ACh</sub> channels in patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2007;74:426-37.

**Table 1.** Patient characteristics.

	SR	AF
Patients ( <i>n</i> )	26	15
Mean age (years)	72±2	66±3
Male/Female ( <i>n</i> )	15/11	9/6
Surgery		
Valve surgery ( <i>n</i> )	11	9
CABG surgery ( <i>n</i> )	5	2
Combined ( <i>n</i> )	10	4
Cardiopathy		
Valvular ( <i>n</i> )	10	9
Ischemic ( <i>n</i> )	5	2
Valvular+Ischemic ( <i>n</i> )	11	4
Hypertension ( <i>n</i> )	16	6
Diabetes mellitus ( <i>n</i> )	9	4
Dyslipidemia ( <i>n</i> )	14	4
Left atrial diameter (cm)	4.4±0.2	5.1±0.2*
Ejection fraction (%)	50.0±3.0	45.3±3.3
NYHA functional class		
I ( <i>n</i> )	3	1
II ( <i>n</i> )	8	5
III ( <i>n</i> )	12	8
IV ( <i>n</i> )	3	1
Creatinine (mg/dL)	0.97±0.05	0.90±0.05
Pulmonar systolic pressure (mm Hg)	45.4±3.8	48.4±3.7
Treatment		
Beta blockers ( <i>n</i> )	11	10
ACE inhibitors/ARBs ( <i>n</i> )	20	8
Statins ( <i>n</i> )	14	7
Acetylsalicylic acid ( <i>n</i> )	15	6
Digoxin ( <i>n</i> )	0	6
Calcium antagonists ( <i>n</i> )	5	1
Diuretics ( <i>n</i> )	10	10
Spironolactone ( <i>n</i> )	1	2
Clopidogrel ( <i>n</i> )	1	1
Oral anticoagulants ( <i>n</i> )	0	8
Class I Antiarrhythmic drugs ( <i>n</i> )	0	1
Class III Antiarrhythmic drugs ( <i>n</i> )	0	2

ACE, angiotensin converting enzyme; ARBs, angiotensin II type 1 receptor blockers; CABG, coronary artery bypass grafting. \* P<0.05 vs. SR patients.

**Table 2.** Sequence of the primers used in this study.

<b>Protein</b>	<b>Primer sequence</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>Annealing Temp (°C)</b>
Kv4.3	F 5'- CTTCAACGAGGACACCAA- 3'	51.9	53.7
	R 5'- AGAGCCGCAGGAGGTA-3'	52.2	
Kv1.5	F 5'- GGCTGACAACCAGGGAA-3'	54.6	55.4
	R 5'- CTCCCATTCCTACTCCA-3'	51.7	
Kv7.1	F 5'-GCTTCCTGAGGGGAGA- 3'	50.4	51.2
	R 5'- ACACCTTCCTGAGACGAA- 3'	49.4	
KCNE1	F 5'- ACACCTTCCTGAGACGAA- 3'	50.6	54.1
	R 5'- TTCAGGGAGATGTGTGCA- 3'	52.4	
GAPDH	F 5'- CAAGAAGGTGGTGAAGCA- 3'	52.3	Variable*
	R 5'-TGGGCCATGAGGTCCA- 3'	55.9	
PKC $\alpha$	F 5'- CCTTAGGCGAGTGTGGTGA- 3'	56.5	Variable*
	R 5'- CTTCTCTGGCTCCTTCCTGA- 3'	55.6	

T<sub>m</sub>: Theoretical primer melting temperature

\* The annealing temperature of the internal standards corresponded to that of the mRNA problem in each case.

**Table 3.** Time course and voltage-dependence of  $I_{to1}$  inactivation.

		Time course of $I_{to1}$ inactivation		Voltage dependence of $I_{to1}$ inactivation	
		$\tau_f$ (ms)	$\tau_s$ (ms)	$V_h$ (mV)	$k$
SR	LAA	20.1±1.7	129.6±22.9	-40.3±1.6	8.2±0.5
	RAA	20.2±1.4	152.1±23.3	-38.9±1.8	8.5±0.6
CAF	LAA	25.6±2.8	140.6±24.8	-32.1±1.4	7.1±0.4
	RAA	25.1±3.8	120.3±17.2	-37.1±2.4	7.9±0.5

CAF= chronic atrial fibrillation; LAA= left atrial appendages; RAA= right atrial appendages;

SR= sinus rhythm;  $\tau$ = time constant;  $V_h$  and  $k$ = midpoint and slope of the inactivation curve.

### **III. RESULTADOS :**

**2) Chronic atrial fibrillation up-regulates  $\beta$ 1-Adrenoceptors affecting repolarizing currents and action potential duration.**

**González de la Fuente M**, Barana A, Gómez R, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Sacristán S, Atienza F, Pita A, Pinto A, Fernández-Avilés F, Caballero R, Tamargo J, Delpón E. *Cardiovasc Res.* 2012 Nov 7



# Chronic atrial fibrillation up-regulates $\beta$ 1-Adrenoceptors affecting repolarizing currents and action potential duration

Marta González de la Fuente<sup>1†</sup>, Adriana Barana<sup>1†</sup>, Ricardo Gómez<sup>1</sup>, Irene Amorós<sup>1,2</sup>, Pablo Dolz-Gaitón<sup>1,2</sup>, Sandra Sacristán<sup>1,2</sup>, Felipe Atienza<sup>2,3</sup>, Ana Pita<sup>2,3</sup>, Ángel Pinto<sup>2,3</sup>, Francisco Fernández-Avilés<sup>2,3</sup>, Ricardo Caballero<sup>1,2\*</sup>, Juan Tamargo<sup>1</sup>, and Eva Delpón<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain; <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain; and <sup>3</sup>Cardiology and Cardiovascular Surgery Services, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid 28007, Spain

Received 14 February 2012; revised 21 September 2012; accepted 5 October 2012; online publish-ahead-of-print 11 October 2012

Time for primary review: 26 days

<b>Aims</b>	$\beta$ -adrenergic stimulation has profound influence in the genesis and maintenance of atrial fibrillation (AF). However, the effects of $\beta$ -Adrenoceptor stimulation on repolarizing currents and action potential (AP) characteristics in human atrial myocytes from left (LAA) and right atrial appendages (RAA) obtained from sinus rhythm (SR) and chronic atrial fibrillation (CAF) patients have not been compared yet.
<b>Methods and results</b>	Currents and APs were recorded using whole-cell patch-clamp in RAA and LAA myocytes from SR and CAF patients. Isoproterenol concentration-dependently decreased the $\text{Ca}^{2+}$ -independent 4-aminopyridine-sensitive component of the transient outward current ( $I_{\text{to1}}$ ) and the inward rectifying current ( $I_{\text{K1}}$ ). CAF significantly enhanced this inhibition, this effect being more marked in the left than in the right atria. CAF dramatically enhanced $\beta$ -Adrenoceptor-mediated increase in the slow component of the delayed rectifier current ( $I_{\text{Ks}}$ ), whose density was already markedly increased by CAF. Conversely, the ultrarapid component of the delayed rectifier current ( $I_{\text{Kur}}$ ) of both SR and CAF myocytes was insensitive to low isoproterenol concentrations. As a consequence, stimulation of $\beta$ 1-Adrenoceptors in SR myocytes lengthened, whereas in CAF myocytes shortened, the AP duration. Quantitative PCR revealed that CAF up-regulated $\beta$ 1-Adrenoceptor expression, preferentially in the left atria.
<b>Conclusion</b>	The present results demonstrate that CAF increases the effects of $\beta$ 1-Adrenoceptor stimulation on repolarizing currents by means of a chamber-specific up-regulation of the receptors. This, together with the ion channel derangements produced by CAF, could contribute to the long-term stabilization of the arrhythmia by shortening the AP duration.
<b>Keywords</b>	Chronic atrial fibrillation • Voltage-dependent and inward rectifying potassium channels • $\beta$ -Adrenoceptors • Electrical remodelling • Human myocytes • Right and left atria

## 1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia and contributes to population morbidity and mortality.<sup>1,2</sup> Presently available therapeutic approaches have major limitations,<sup>1,2</sup> therefore, an improved understanding of the mechanistic insights of the disease is needed for the development of novel therapeutic approaches.

Acute and chronic atrial fibrillation (CAF) are characterized by shortening of the action potential (AP) duration (APD) and atrial refractory period (ARP), increased ARP dispersion, and loss of APD adaptation to changes in frequency.<sup>1,2</sup> Such alterations in atrial electrical properties (*electrical remodelling*) are caused by derangements in ion channel expression.<sup>1–3</sup> Importantly, it has been demonstrated that AF-induced electrical remodelling promotes AF maintenance (AF begets AF).<sup>1–3</sup> Indeed, the shorter the ARP the faster and

<sup>†</sup> These authors are contributed equally.

\* Corresponding author. Tel: +34 91 394 14 74; fax: +34 91 394 14 70, Email: rcaballero@med.ucm.es

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2012. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.



more stable the re-entry of electrical impulses that sustain the arrhythmia. Among changes of atrial ion channels there are some that do not apparently contribute to the shortening of the ARP, for instance, the expression decrease in the channels generating the ultra-rapid component of the delayed rectifier current ( $I_{Kur}$ ), and the  $\text{Ca}^{2+}$ -independent 4-aminopyridine (4-AP)-sensitive component of the transient outward current ( $I_{to1}$ ).<sup>3,4</sup> Conversely, there are other changes that seem to critically contribute to the abbreviation of APD and ARP. Such is the case of the expression decrease in the channels that generate the depolarizing L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{CaL}$ ).<sup>5</sup> Moreover, CAF increases the expression of channels that underlie the repolarizing inward rectifier ( $I_{K1}$ ) and the constitutively active acetylcholine-dependent ( $I_{KACh}$ ) currents.<sup>6,7</sup> In the same line, we recently demonstrated that the slow component of the delayed rectifier current ( $I_{Ks}$ ) is markedly increased in both left (LA) and right (RA) atrial myocytes from CAF patients.<sup>8</sup> Since  $I_{Ks}$  contributes to AP final phase repolarization more at fast than at slow rates,<sup>9</sup> we proposed that  $I_{Ks}$  increase would also critically contribute to the abbreviation of APD and ARP, and, thus, to AF maintenance and recurrence.

Several data suggest that adrenergic stimulation may be involved in the initiation and/or maintenance of AF.<sup>10</sup> However, it is unclear how adrenergic stimulation affects the various electrophysiological mechanisms that could underlie AF. Previous data demonstrated that CAF is associated with an enhanced effect of isoproterenol to increase  $I_{CaL}$ .<sup>5</sup> Conversely, data on the effects of  $\beta$ -adrenergic stimulation on  $\text{K}^{+}$  repolarizing currents and atrial AP characteristics in patients with CAF are currently unavailable. Thus, in this work we analysed the effects of  $\beta$ -Adrenoceptor stimulation on  $I_{to1}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Ks}$ , and  $I_{K1}$  recorded in myocytes obtained from left (LAA) and right (RAA) atrial appendages from sinus rhythm (SR) and CAF patients. We also analysed the effects of isoproterenol on the characteristics of the APs recorded in SR and CAF myocytes. The results demonstrated that CAF markedly enhanced  $\beta$ -Adrenoceptor-mediated effects by increasing the expression of  $\beta 1$ -Adrenoceptors. As a consequence of AF-induced changes in channels and receptors stimulation of  $\beta$ -Adrenoceptors in CAF myocytes significantly shortened the APD, an effect that could contribute to the perpetuation of the arrhythmia.

## 2. Methods

The study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario Gregorio Marañón (CNIC-13) and conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Each patient gave written informed consent.

### 2.1 Electrophysiological analysis

#### 2.1.1 Human atrial myocyte isolation

Myocytes were enzymatically isolated from RAA and LAA samples, obtained from 36 patients in SR and 32 patients with CAF that underwent cardiac surgery, following methods previously described.<sup>8</sup> Clinical data of patients are summarized in Supplementary material online, Table S1.

#### 2.1.2 Recording of ionic currents

Currents were recorded at room temperature using the whole-cell patch-clamp configuration (micropipette resistance  $< 3.5 \text{ M}\Omega$ ). Series resistance was compensated manually and usually  $\geq 80\%$  compensation was achieved. Under our experimental conditions no significant voltage errors ( $< 5 \text{ mV}$ ) due to series resistance were expected with the micropipettes used. Currents were filtered at half the sampling frequency.

#### 2.1.3 Pulse protocols

The protocol to record  $I_{to1}$  and  $I_{sus}$  consisted of 250 ms pulses from  $-80 \text{ mV}$  to potentials ranging  $-90$  and  $+50 \text{ mV}$ .<sup>8</sup> A 25 ms prepulse to  $-40 \text{ mV}$  was applied to inactivate the inward  $\text{Na}^{+}$  current ( $I_{Na}$ ).  $I_{Ks}$  was recorded by applying 4 s pulses from  $-40 \text{ mV}$  to potentials ranging  $-40$  and  $+60 \text{ mV}$  and tail currents were elicited upon repolarization to  $-30 \text{ mV}$  in cells previously superfused with  $2 \text{ mM}$  4-AP.<sup>8</sup>  $I_{K1}$  was recorded by applying 250 ms pulses from  $-120$  to  $+20 \text{ mV}$  or by applying 50 ms pulses from  $-80 \text{ mV}$  to  $-100 \text{ mV}$  followed by depolarizing ramps to  $+20 \text{ mV}$  (800 ms).<sup>8</sup> Finally,  $I_{CaL}$  was recorded by applying 500 ms pulses that were imposed in  $5 \text{ mV}$  increments between  $-40$  and  $+50 \text{ mV}$  from a holding potential of  $-80 \text{ mV}$ .  $I_{Na}$  was inactivated by the application of a 50 ms prepulse to  $-30 \text{ mV}$ .

#### 2.1.4 Recording of action potentials

APs were recorded at room temperature using the current clamp configuration.<sup>11</sup> Tip resistance of the micropipettes used was  $> 7 \text{ M}\Omega$  to ensure high quality gigaseals and minimal depolarization of membrane potential. APs were elicited by 2 ms depolarizing current pulses at 1.5 times the current threshold at a frequency of  $1 \text{ Hz}$ .

## 2.2 Mathematical model of a human atrial action potential

Effects of isoproterenol on SR human atrial APs driven at  $1 \text{ Hz}$  were simulated using the mathematical model of 'type 3' AP developed by Courtemanche et al.<sup>12</sup> by incorporating the experimentally measured isoproterenol effects on  $I_{to1}$ ,  $I_{Ks}$ , and  $I_{CaL}$  (Supplementary material online). CAF-remodelled type 3 APs were obtained considering a 70% reduction in  $I_{CaL}$ , a 50% reduction in  $I_{to1}$  and  $I_{Kur}$ ,<sup>12</sup> and a 100% increase in  $I_{K1}$  and  $I_{Ks}$ . Finally, we also modelled CAF APs without considering the  $I_{Ks}$  increase.

### 2.3 Drugs

Drugs were dissolved as appropriate to yield  $0.01 \text{ M}$  stock solutions. Stock solutions of isoproterenol were prepared fresh daily in deionized water containing  $0.04\%$  ascorbic acid.

### 2.4 Analysis of the mRNA expression

Total RNA was isolated from human atrial appendages obtained from 5 SR and CAF patients, respectively (Supplementary material online, Table S2),<sup>8,11</sup> and real-time quantitative PCR (qPCR) using Taqman-based ABI gene expression assays was performed. The cycle to threshold (Ct) values corresponding to mRNA levels were normalized to 18S rRNA. To compare expression differences, the respective data were transformed from  $\Delta\text{Ct}$  values to equivalent fold differences as described in the Supplementary material online.

### 2.5 Statistical methods

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. An unpaired  $t$ -test or one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test were used to assess statistical significance. Comparisons between categorical variables were done using Fisher's exact test. A value of  $P < 0.05$  was considered significant. A multiple linear regression was used to identify putative associations between isoproterenol-induced effects and some clinical characteristics or pharmacological treatments of the patients. To make comparisons between two different concentration-response curves, an  $F$ -test was used. All experimental procedures are exhaustively described in the Supplementary material online.

## 3. Results

For electrophysiological experiments, we analysed 36 and 32 samples obtained from SR and CAF patients (Supplementary material online,

Table S1), respectively. The mean size of CAF myocytes was greater than that of SR myocytes as assessed by cell capacitance measurement ( $112 \pm 4.7$  vs.  $78.9 \pm 3.5$  pF,  $n = 234$ ,  $P < 0.001$ ). In both SR and CAF patients, cell capacitance of LAA myocytes was indistinguishable from RAA myocytes (Supplementary material online, Figure S1A).

As previously demonstrated<sup>8</sup> randomized selection of healthy rod-shaped LAA and RAA myocytes obtained from SR patients resulted in three types of cells according to the voltage-dependent  $K^+$  currents elicited at plateau potentials (Supplementary material online, Figure S1B).  $I_{to1}$ -predominant cells accounted for  $\sim 30\%$  of the cells and exhibited an outward current mainly composed of a fast-activating and inactivating  $I_{to1}$ .  $I_{to1}$  was completely absent in  $\sim 30\%$  of the cells which presented a fast-activating non-inactivating current ( $I_{sus}$  predominant). The most abundant cells were those that exhibited both  $I_{to1}$  and sustained currents (intermediate pattern). CAF modified the distribution of these cell types mainly by decreasing the percentage of  $I_{to1}$ -predominant cells in both atria (Supplementary material online, Figure S1C).

### 3.1 Effects of isoproterenol on $I_{to1}$

Figure 1A and B shows the effects of isoproterenol (1 nM), a  $\beta$ -Adrenoceptor agonist, on currents elicited by 250 ms pulses from  $-80$  mV to potentials ranging from  $-90$  to  $+50$  mV in RAA cells with an intermediate pattern obtained from an SR and a CAF patient. At very positive potentials, an outward current was composed of  $I_{to1}$  and  $I_{sus}$ . In both SR and CAF myocytes, isoproterenol decreased peak current amplitude, whereas it did not modify the  $I_{sus}$  measured at the end of the test pulses.

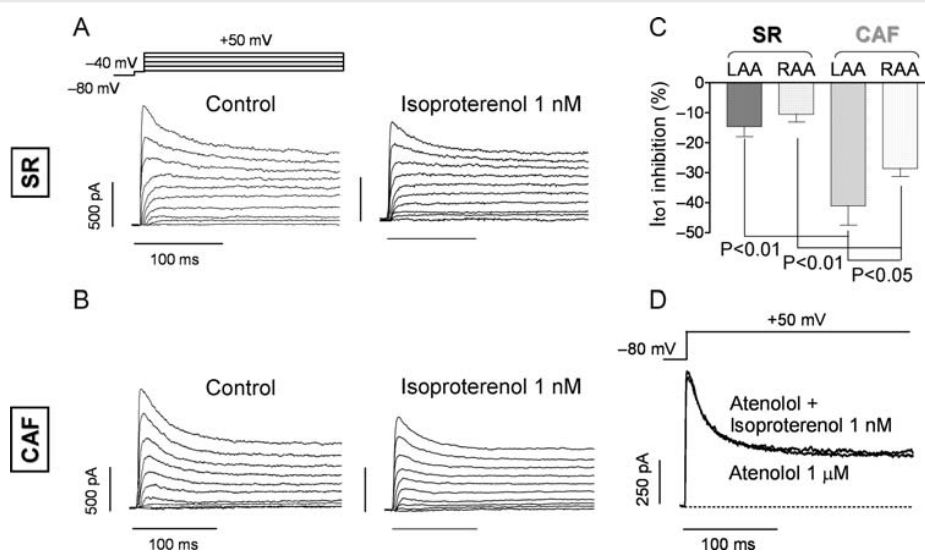
Supplementary material online, Figure S2 shows  $I_{to1}$  density–voltage relationships for LAA and RAA myocytes from SR and CAF patients in the absence and presence of isoproterenol 1 nM.  $I_{to1}$  was measured, in cells with  $I_{to1}$ -predominant and intermediate patterns, as the difference between the peak and the current at the end of the 250 ms

pulse. Our results confirmed that CAF reduced  $I_{to1}$  density in both atria, the effect being significantly more marked in the LAA than in the RAA.<sup>8</sup> As can be observed, in SR and CAF myocytes isoproterenol significantly decreased  $I_{to1}$  density at potentials  $> +20$  mV in both LAA and RAA cells (Supplementary material online, Figure S2).

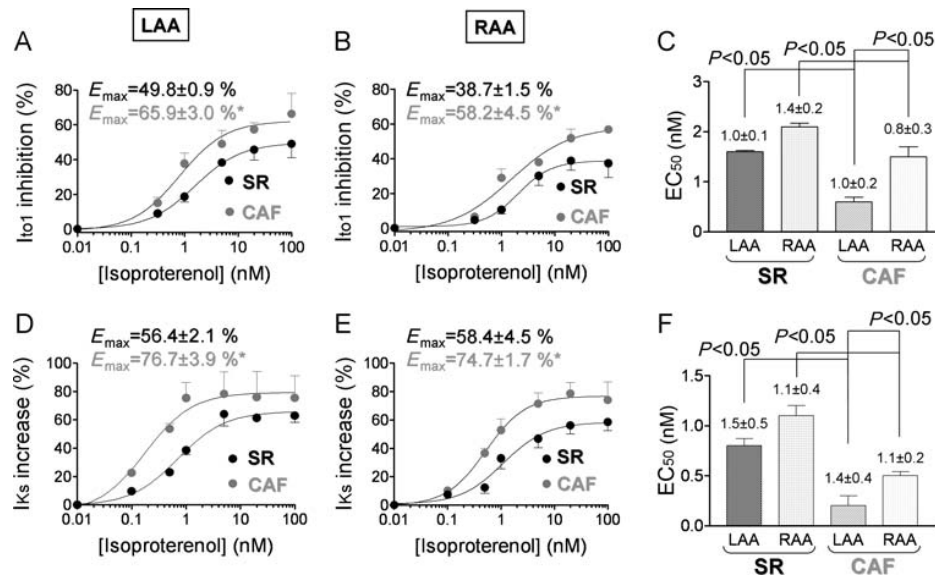
We further analysed the isoproterenol-induced decrease in  $I_{to1}$  density at  $+30$  mV, a positive membrane potential easily reached under physiological conditions (Figure 1C). In SR cells isoproterenol similarly decreased  $I_{to1}$  density in both atria. Compared with SR, CAF significantly enhanced the isoproterenol-induced  $I_{to1}$  inhibition, an effect that was significantly greater in the LAA than in the RAA ( $n = 16$ ,  $P < 0.05$ ). Importantly, isoproterenol effects were prevented in both SR and CAF cells by atenolol (1  $\mu$ M), a  $\beta_1$ -selective adrenoceptor antagonist (Figure 1D), suggesting that  $I_{to1}$  inhibition was mediated by  $\beta_1$ -Adrenoceptor stimulation.

Since isoproterenol-induced  $I_{to1}$  inhibition has never been reported before, we explored the underlying signalling pathway. The results demonstrated that the isoproterenol  $I_{to1}$  inhibitory effects were abolished in the presence of either 9-cyclopentyladenine, a selective inhibitor of adenylyl cyclase (AC), or by the intracellular dialysis with PKI, a protein kinase A (PKA) inhibitor (Supplementary material online, Figure S3). Thus, our preliminary results suggested that the  $I_{to1}$  inhibition was mediated by the canonical signalling pathway of  $\beta_1$ -Adrenoceptors.

The concentration that produces the half-maximum effect ( $EC_{50}$ ), the maximum effect ( $E_{max}$ ), and the Hill coefficient ( $n_H$ ) were calculated by fitting the Hill equation to the  $I_{to1}$  inhibition produced by different isoproterenol concentrations in LAA and RAA cells from SR and CAF patients (Figure 2A and B). Comparison of the  $EC_{50}$  confirmed that in both atria isoproterenol more potently inhibited  $I_{to1}$  in CAF than in SR cells (Figure 2C) the effect being significantly more marked in the LAA than in the RAA. Isoproterenol produced



**Figure 1** Effects of isoproterenol on  $K^+$  currents elicited in two RAA cells obtained from an SR (A) and a CAF (B) patient. (C) Percentage of isoproterenol-induced  $I_{to1}$  inhibition at  $+30$  mV in LAA and RAA myocytes from SR and CAF patients. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of  $n > 8$ . (D) Effects of isoproterenol in the presence of atenolol on  $K^+$  currents recorded in an RAA myocyte from a CAF patient.



**Figure 2**  $I_{to1}$  density reduction at +30 mV as a function of isoproterenol concentration in LAA (A) and RAA (B) myocytes from SR and CAF patients. Isoproterenol-induced  $I_{Ks}$  increase at +30 mV in LAA (D) and RAA (E) myocytes from SR and CAF patients. Continuous lines represent the fit of a Hill equation to the data. \* $P < 0.05$  vs. SR. (C and F)  $EC_{50}$  values for the isoproterenol-induced  $I_{to1}$  inhibition (C) and  $I_{Ks}$  increase (F) in LAA and RAA myocytes from SR and CAF patients. In (C) and (F), Hill coefficients appear over the data bar. Each point/bar represents the mean  $\pm$  SEM of  $n > 8$ .

a voltage- and time-independent  $I_{to1}$  inhibition since it did not modify the midpoint of the inactivation curve or the time constant of  $I_{to1}$  inactivation either in SR or CAF myocytes (Supplementary material online, Figure S4 and Table S3).

### 3.2 Effects of isoproterenol on $I_{sus}$

Supplementary material online, Figure S5 shows the effects of isoproterenol (1 nM) in  $I_{sus}$ -predominant RAA cells obtained from an SR and a CAF patient, respectively. Supplementary material online, Figure S6 shows  $I_{sus}$  density–voltage relationships obtained in LAA and RAA cells from SR and CAF patients.  $I_{sus}$  amplitude was measured at the end of 250 ms pulses in intermediate pattern and  $I_{sus}$ -predominant cells. The results confirmed that  $I_{sus}$  density decreased in CAF myocytes, this effect being more marked in the RAA than in the LAA.<sup>8</sup> Supplementary material online, Figures S5 and S6 show that isoproterenol did not modify  $I_{sus}$  recorded either in SR or CAF cells at any of the voltages tested.  $I_{sus}$  is mainly ( $\sim 70\%$ ) carried by the  $I_{Kur}$ <sup>8</sup> and treatment of  $I_{sus}$ -predominant and intermediate pattern cells with 10 mM tetraethylammonium (TEA) and 1  $\mu$ M dofetilide leaves  $I_{Kur}$  unaffected.<sup>8,13</sup> Thus, we further analysed the effects of isoproterenol on  $I_{Kur}$  measured as the TEA + dofetilide-resistant current (Supplementary material online, Figure S5D). Under these conditions, isoproterenol did not modify the  $I_{Kur}$  recorded in SR and CAF myocytes.

### 3.3 Effects of isoproterenol on $I_{Ks}$

4-AP at 2 mM simultaneously blocks  $I_{Kur}$  and  $I_{to1}$ .<sup>13</sup> Figure 3A and B shows the effects of isoproterenol on 2 mM 4-AP-resistant currents elicited in SR and CAF myocytes from the RAA. Supplementary material online, Figure S7 shows  $I_{Ks}$  density–voltage relationships obtained in LAA and RAA cells from SR and CAF patients in the

presence and absence of isoproterenol. The 4-AP-resistant component amplitude (measured as the difference between the amplitude at the end and the beginning of the pulse) was small in SR cells, its density being similar in RAA and LAA cells ( $0.2 \pm 0.03$  pA/pF at +30 mV,  $n = 16$ ) (Supplementary material online, Figure S7).<sup>8</sup> Importantly, in both LAA and RAA cells obtained from CAF patients  $I_{Ks}$  amplitude increased 2.5-fold compared with LAA and RAA cells from SR patients ( $0.5 \pm 0.06$  pA/pF at +30 mV,  $n = 30$ ,  $P < 0.01$  vs. SR). Here, we confirm,<sup>8</sup> that in both SR and CAF myocytes, the 2 mM 4-AP-resistant voltage-dependent  $K^+$  current is  $I_{Ks}$ , since it is sensitive to TEA (10 mM) and HMR-1556 (1  $\mu$ M) (Supplementary material online, Figure S8),<sup>8</sup> exhibits very slow activation kinetics (Supplementary material online, Figure S8 and Table S4) and a voltage dependence also congruent with those of  $I_{Ks}$  (Supplementary material online, Table S4).<sup>8</sup> Isoproterenol significantly increased  $I_{Ks}$  density at potentials  $> +20$  mV and  $> -20$  mV in SR and CAF myocytes, respectively (Supplementary material online, Figure S7).

Figure 3C analyses the isoproterenol-induced increase in  $I_{Ks}$  density at +30 mV in SR and CAF cells. Importantly, in CAF cells  $I_{Ks}$  augmentation was significantly more marked than in SR cells and significantly greater in LAA than in RAA cells. Moreover,  $I_{Ks}$  augmenting effects produced by isoproterenol were abolished in the presence of atenolol (Figure 3D).

Figure 2D and E shows the increase in  $I_{Ks}$  density at +30 mV as a function of isoproterenol concentration. The results demonstrated that isoproterenol was significantly more potent for increasing  $I_{Ks}$  in CAF than in SR cells this effect being more marked in LAA than in RAA cells (Figure 2F). In CAF myocytes, effects of isoproterenol on  $I_{Ks}$  were voltage- and time-dependent, since they were accompanied by a leftward shift of the midpoint of the activation curve and an acceleration of the activation kinetics (Supplementary material online,

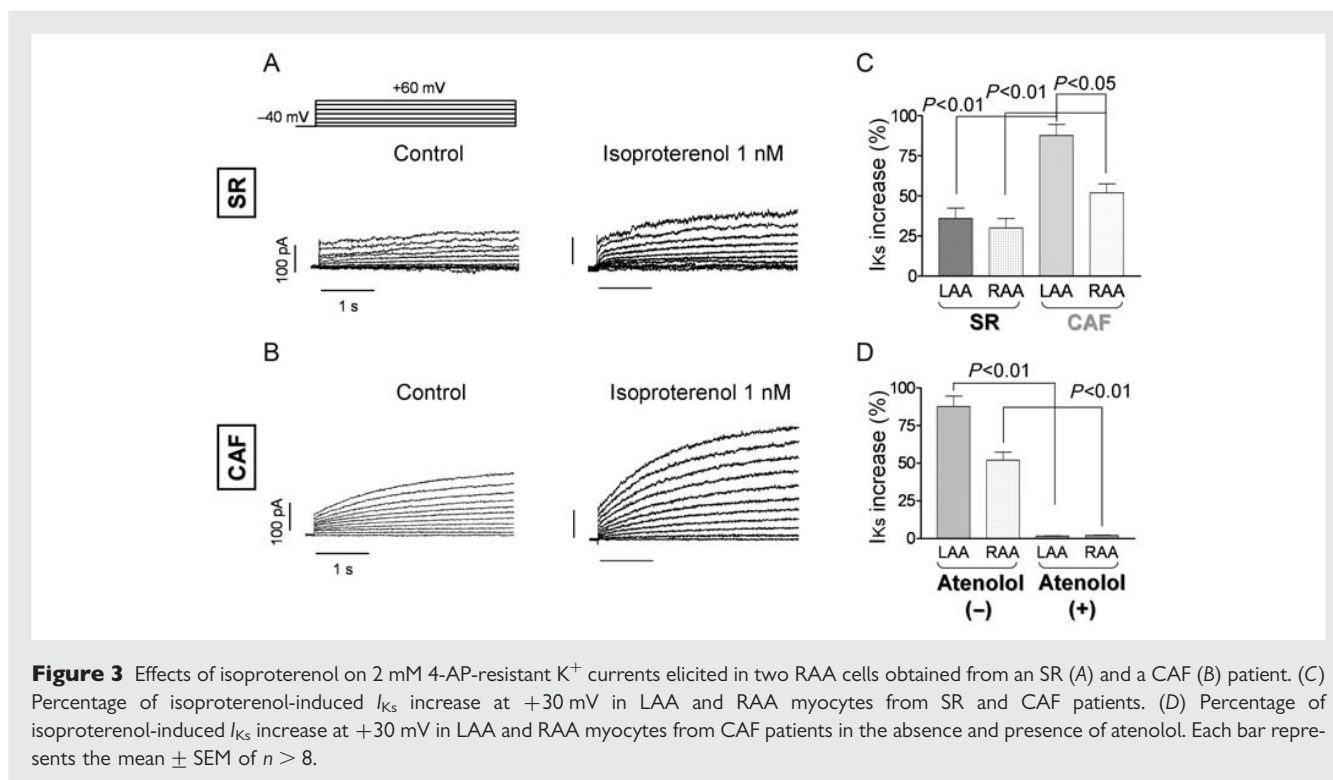


Table S4). Conversely, channel deactivation was not significantly modified (Supplementary material online, Table S4).

### 3.4 Effects of isoproterenol on $I_{K1}$

Figure 4A shows  $I_{K1}$  traces recorded by applying voltage-ramps in an LAA myocyte from a CAF patient in the absence and presence of isoproterenol. Inward rectifier currents were recorded in the presence of glibenclamide (10  $\mu$ M) and atropine (1  $\mu$ M) and were inhibited by BaCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M), thus suggesting that the current recorded under these conditions was actually  $I_{K1}$ .<sup>11</sup> Figure 4C and D shows the effects of isoproterenol on  $I_{K1}$  density–voltage curves obtained in LAA and RAA cells from SR and CAF patients.  $I_{K1}$  amplitude was measured at the end of 250 ms pulses applied from  $-80$  mV to potentials ranging from  $-120$  to  $+20$  mV. The results confirmed data previously reported, i.e.  $I_{K1}$  density significantly augments in CAF myocytes<sup>7</sup> and demonstrated that isoproterenol only inhibited  $I_{K1}$  at potentials negative to the K<sup>+</sup> reversal potential ( $E_K$ ). The percentage of  $I_{K1}$  block at  $-100$  mV (Figure 4B) and the analysis of the concentration dependence (Figure 4E and F) demonstrated that CAF significantly enhanced the isoproterenol inhibitory effects on  $I_{K1}$  in both atria.

### 3.5 $\beta$ 1-Adrenoceptor remodelling

We next investigated the expression level of AC V (ACV) and VI (ACVI), phosphodiesterase 3A (PDE3A) and 4D (PDE4D), and  $\beta$ 1-Adrenoceptors. Ct values corresponding to  $\beta$ 1-Adrenoceptor mRNA levels normalized to 18S rRNA ( $\Delta$ Ct) were significantly lower in CAF than in SR samples ( $n = 20$ ) (Figure 5A). Transformation of  $\Delta$ Ct to fold differences demonstrated that  $\beta$ 1-Adrenoceptor expression was 27% greater in CAF than in SR (Figure 5B). Conversely, no significant differences were found in mRNA levels of ACV, ACVI,

PDE3A, and PDE4D between CAF and SR samples. Furthermore, the increase in  $\beta$ 1-Adrenoceptor expression was greater in the LAA than in the RAA (Figure 5C).

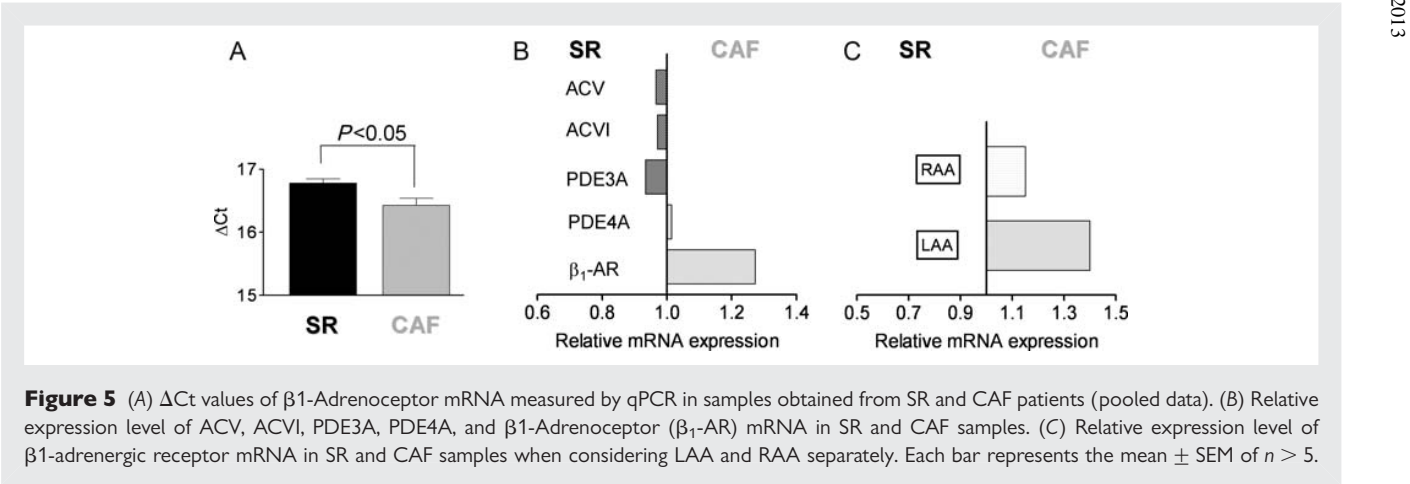
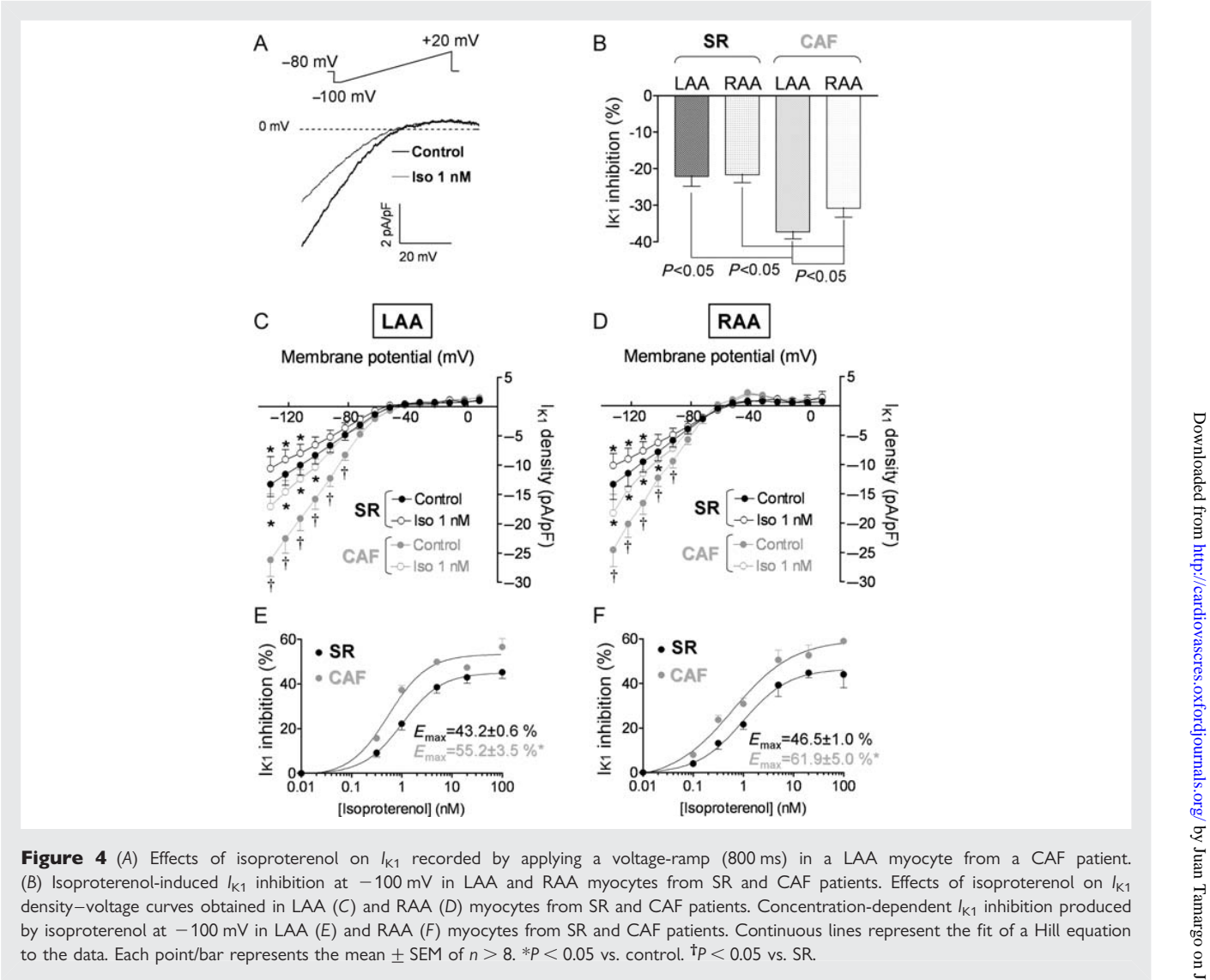
### 3.6 Effects of isoproterenol on APD

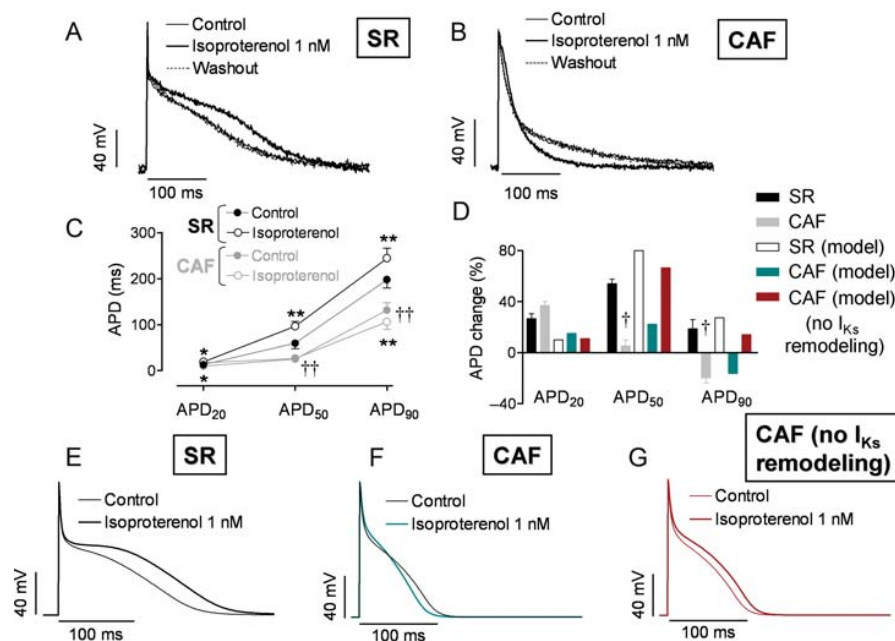
We analysed the effects of  $\beta$ -Adrenoceptor stimulation on APs recorded in SR and CAF myocytes from the RAA. Figure 6A and B shows examples of APs recorded in RAA cells obtained from an SR and a CAF patient, respectively. Under our experimental conditions a single type of AP was recorded either in SR or CAF cells. However, as is evident in Figure 6, APs recorded in CAF myocytes were quite different from those recorded in SR cells since they were significantly shorter in duration.<sup>3</sup> This APD shortening reached statistical significance when measured at 50% (APD<sub>50</sub>) and 90% (APD<sub>90</sub>) of repolarization (Figure 6C). Moreover, resting membrane potential (RMP) was significantly more hyperpolarized in CAF ( $-74.8 \pm 2.3$  mV) than in SR myocytes ( $-68.3 \pm 1.5$  mV,  $P < 0.05$ ). Isoproterenol 1 nM did not significantly modify AP amplitude or RMP either in SR or CAF cells. In SR cells, isoproterenol significantly lengthened the APD measured at 20% (APD<sub>20</sub>) of repolarization, as well as APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub> (Figure 6C and D). Conversely, in CAF myocytes isoproterenol significantly lengthened the APD<sub>20</sub> and, more importantly, it shortened the APD<sub>90</sub> (Figure 6C and D). Thus, these results suggest, for the first time, that  $\beta$ 1-Adrenoceptor stimulation could differentially modify APD in SR and CAF myocytes, by promoting, in the latter, the shortening of the APD<sub>90</sub>.

### 3.7 Effects of isoproterenol on $I_{CaL}$

Since  $I_{CaL}$  plays a key role in determining APD, we analysed the effects of isoproterenol on  $I_{CaL}$  recorded in RAA SR and CAF myocytes. Our results confirmed previous observations<sup>5</sup> demonstrating that CAF







**Figure 6** Representative AP traces recorded in two RAA myocytes obtained from an SR (A) and a CAF (B) patient in control conditions and in the presence of 1 nM isoproterenol. (C) APD measured at 20, 50, and 90% of repolarization in RAA myocytes from SR and CAF patients in the absence and presence of isoproterenol. \* $P < 0.05$  vs. control. \*\* $P < 0.01$  vs. control. †† $P < 0.01$  vs. SR. (D) Percentage of change in the APD produced by isoproterenol in SR and CAF myocytes. † $P < 0.05$  vs. SR. In (C) and (D), each point/bar represents the mean  $\pm$  SEM of  $n > 8$ . Mathematically modelled steady-state APs obtained in SR (E) and CAF (F) myocytes in the absence and presence of isoproterenol at a frequency of 1 Hz. (G) Effects of isoproterenol on a CAF-remodelled AP simulated without considering the CAF-induced increase on  $I_{Ks}$ .

markedly decreased  $I_{CaL}$  density (from  $-2.1 \pm 0.4$  to  $0.97 \pm 0.2$  pA/pF at +5 mV,  $n = 10$ ,  $P < 0.01$ ). Supplementary material online, Figure S9A demonstrated that 1 nM isoproterenol slightly but significantly increased  $I_{CaL}$  ( $13.5 \pm 1.6\%$  at +5 mV,  $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ), the  $EC_{50}$  and the  $E_{max}$  for this effect being  $18.2 \pm 1.9$  nM and  $156 \pm 3.5\%$ , respectively (Supplementary material online, Figure S9C). CAF significantly enhanced the isoproterenol increasing effects on  $I_{CaL}$ , the  $EC_{50}$  and  $E_{max}$  for this effect being  $4.8 \pm 0.7$  nM and  $300 \pm 21.3\%$ , respectively (Supplementary material online, Figure S9C). In fact, 1 nM isoproterenol increased  $I_{CaL}$  by  $24.1 \pm 3.1\%$  (at +5 mV,  $n = 10$ ,  $P < 0.05$  vs. SR) (Supplementary material online, Figure S9B).

### 3.8 Mathematical model of SR and CAF-remodelled AP

To get further insight on the mechanism responsible for the differential effects of isoproterenol on APD in SR and CAF myocytes, we ran a mathematical model of 'type 3' human atrial AP developed by Courtemanche *et al.*<sup>12</sup> Among the three types described by the model we selected 'type 3' AP because its triangular shape is almost identical to that of the APs we recorded experimentally (Figure 6E). To simulate the effects of 1 nM isoproterenol in RAA SR myocytes,  $I_{to1}$  conductance was reduced by 10.6%, whereas  $I_{Ks}$  and  $I_{CaL}$  conductance were increased by 30.0, and 13.5%, respectively. The effects of isoproterenol on  $I_{K1}$  were not considered since they only appeared at potentials negative to the  $E_K$ . Isoproterenol produced an APD prolongation (Figure 6E), whose magnitude was similar to that obtained experimentally (Figure 6D).

To simulate 'type 3' AP under CAF conditions  $I_{CaL}$ ,  $I_{to1}$ , and  $I_{Kur}$  conductances were decreased by 70, 50, and 50%, respectively, as described by Courtemanche *et al.*<sup>12</sup> Additionally, we included a 100% increase in  $I_{Ks}$  and  $I_{K1}$  to take into consideration CAF-induced modifications that have been described after the model had been published (Figure 6F).<sup>7,8</sup> To simulate the effects of 1 nM isoproterenol in CAF-remodelled AP,  $I_{to1}$  conductance was reduced by 28.7%, whereas  $I_{Ks}$  and  $I_{CaL}$  conductance were increased by 52.0 and 24.1%, respectively. Moreover, the effects of isoproterenol on the activation kinetics and the voltage-dependence of the activation of  $I_{Ks}$  were also considered. Under these conditions, the model reproduced the isoproterenol-induced shortening of APD<sub>90</sub> (Figure 6F) which was of similar magnitude to that experimentally obtained (Figure 6D). Finally, we simulated CAF-remodelled APs by incorporating the reduction in  $I_{CaL}$ ,  $I_{to1}$ , and  $I_{Kur}$  and the increase in  $I_{K1}$ , while omitting the increase in  $I_{Ks}$  (control in Figure 6G). Under these conditions, isoproterenol did not shorten but lengthened the APD<sub>90</sub> (Figure 6D and G).

## 4. Discussion

The present results demonstrated that CAF upwardly regulated  $\beta_1$ -Adrenoceptor expression, this effect being more marked in the LAA than in the RAA. As a consequence, in CAF myocytes isoproterenol-mediated  $I_{to1}$  and  $I_{K1}$  inhibition and  $I_{Ks}$  augmentation were significantly enhanced. Moreover, in SR myocytes isoproterenol lengthened whereas in CAF myocytes it further shortened APD<sub>90</sub>.

## 4.1 Effects of isoproterenol on human atrial repolarizing currents

In SR myocytes isoproterenol inhibited  $I_{to1}$  in a concentration-dependent manner, an effect completely prevented by atenolol. Our preliminary results suggested that this  $\beta 1$ -Adrenoceptor-mediated effect is due to the sequential stimulation of AC and PKA. There is a previous report showing that in SR myocytes  $I_{to1}$  was unaffected by 1  $\mu$ M isoproterenol.<sup>14</sup> The reasons for this discrepancy are unknown; however, and besides the difference in the concentrations tested, we hypothesized that it could be due to the effects on membrane proteins of the enzymatic treatment used for myocyte dissociation.

We also demonstrated that  $\beta 1$ -Adrenoceptors stimulation inhibited inward  $I_{K1}$  generated at potentials negative to the  $E_K$ , whereas it did not modify the outward component generated at potentials positive to it. This fact limits the putative physiological relevance of the effect since atrial RMP is generally more depolarized than the  $E_K$ . We further confirmed that  $I_{Kur}$  is weakly sensitive to  $\beta 1$ -Adrenoceptor stimulation<sup>15</sup> since  $I_{Kur}$  was insensitive to isoproterenol concentrations <10 nM. Finally, the results indicated that human  $I_{Ks}$  is extremely sensitive to the increasing effects produced upon  $\beta 1$ -Adrenoceptor stimulation since  $EC_{50}$  values were 0.5–1 nM. It could be argued, however, that isoproterenol increasing effects were only apparent when  $I_{Ks}$  is generated by pulses of long unphysiological duration (4 s) (Figure 3), while they were not present on the sustained current generated at the end of 250 ms pulses (Supplementary material online, Figure S6), whose duration resembles better the atrial APD. This could raise a doubt about the physiological relevance of the data here presented, particularly considering that CAF APD<sub>90</sub> was ~100 ms. However, it should be stressed that  $I_{Ks}$  density, and thus its contribution to cardiac repolarization, markedly increases at increasing driving frequencies particularly following  $\beta$ -Adrenoceptor stimulation.<sup>9,16</sup> Therefore, data obtained with pulses of similar duration to that of human AP applied at very low frequencies are less representative of the  $I_{Ks}$  activated during APs driven at 1 Hz than those obtained with long pulses. To confirm this hypothesis, we ran a previously described mathematical model of  $I_{Ks}$ <sup>16</sup> and compared steady-state  $I_{Ks}$  amplitude reached in SR and CAF cells in the absence and presence of 1 nM isoproterenol (Supplementary material online, Figure S10). As can be observed, there was an increased activation of  $I_{Ks}$  during repetitive stimulation with 150 ms pulses, which suggests that  $I_{Ks}$  accumulated during brief atrial APs will contribute to AP repolarization.

Effects of isoproterenol on  $I_{Kur}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ , and  $I_{CaL}$  on cardiac myocytes from different species have been attributed to the sequential activation of AC and PKA,<sup>10,13,17,18</sup> and thus, signalling pathways were not further studied here. In SR the effects produced by  $\beta 1$ -adrenergic stimulation on these currents were similar in LAA and RAA myocytes. This could be explained because transcriptional levels of  $\beta 1$ -Adrenoceptors, AC, and PDE did not exhibit differences between LAA and RAA.

In CAF myocytes, the effects produced by isoproterenol on  $I_{to1}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ , and  $I_{CaL}$  were significantly greater than those produced in SR myocytes and this enhancement was more marked in the LAA than in the RAA. Quantitative analysis of the  $\beta 1$ -Adrenoceptor mRNA level suggested that CAF produces an up-regulation of  $\beta 1$ -Adrenoceptors which was also greater in the LA than in the RA. Conversely, mRNA levels of those AC and PDE that critically determine the

intensity of the  $\beta 1$ -Adrenoceptor stimulation in cardiac myocytes<sup>19</sup> remained unchanged. Thus, our results suggest that CAF-induced enhancement of  $\beta 1$ -Adrenoceptor-mediated effects on ionic channels could be mainly attributed to a CAF-induced up-regulation of atrial  $\beta 1$ -Adrenoceptors. However, CAF-induced changes in other proteins/enzymes also involved in  $\beta 1$ -Adrenoceptor stimulation cannot be ruled out.

## 4.2 Functional impact

An important goal of this study was to compare the functional impact of  $\beta 1$ -Adrenoceptor stimulation on the characteristics of APs recorded in SR and CAF myocytes. In fact, this was the reason why we selected a low isoproterenol concentration (1 nM), i.e. in an attempt to reproduce as much as possible the physiological setting, in which natural catecholamines reach plasma concentrations of 0.4–1.6 nM.<sup>20</sup> We demonstrated that in SR myocytes isoproterenol mainly prolonged the APD<sub>50</sub> leaving RMP and AP amplitude unaffected. These results agree with previous reports<sup>21</sup> and can be interpreted in the light of isoproterenol effects on each individual current. Indeed, plateau duration is determined by  $I_{CaL}$  amplitude whose depolarizing effects are counterbalanced by the repolarizing  $I_{to1}$  and  $I_{Kur}$ .<sup>5</sup> Therefore, isoproterenol increasing effects on  $I_{CaL}$ , together with its inhibiting effects on  $I_{to1}$ , can account for the APD<sub>50</sub> prolongation observed in SR cells. This hypothesis was confirmed by the results obtained when incorporating the experimentally observed effects of isoproterenol on a mathematical simulation of SR APs.

Interestingly, in CAF myocytes, isoproterenol prolonged APD<sub>20</sub>, did not modify APD<sub>50</sub>, and shortened the APD<sub>90</sub>. This suggested that in CAF myocytes the role of  $I_{CaL}$  in determining the height and duration of the plateau decreases so much that the  $I_{to1}$  inhibition produced by isoproterenol resulted in a prolongation of APD<sub>20</sub>. On the other hand, here we also confirmed that CAF markedly increases  $I_{Ks}$ .<sup>8</sup> Furthermore, CAF markedly enhanced the isoproterenol-increasing effects of  $I_{Ks}$ , which is mainly involved in terminal repolarization.<sup>18,22</sup> The combination of these two CAF-induced changes could account for the APD<sub>90</sub> shortening produced by isoproterenol in CAF myocytes. To confirm this hypothesis, we ran the mathematical model of 'type 3' CAF-remodelled AP as described by Courtemanche et al.<sup>12</sup> However, we additionally included a 100% increase in  $I_{K1}$  and  $I_{Ks}$ . The incorporation of the isoproterenol effects in currents recorded in CAF myocytes produced an APD<sub>90</sub> shortening of similar magnitude to that observed experimentally. However, this result did not discard that the decrease in  $I_{CaL}$  density itself was responsible for the observed effects. Thus, to answer this question we ran the model of a CAF-remodelled AP in which the 100%  $I_{Ks}$  increase was not included. Under these conditions, isoproterenol did not shorten but lengthened APD<sub>90</sub>. Therefore, the results of the mathematical model strongly suggest that the CAF-induced increase on  $I_{Ks}$  is critical to account for the  $\beta 1$ -Adrenoceptor-induced shortening of APD<sub>90</sub> in CAF myocytes.

These are exciting results considering that the duration of terminal repolarization, which is actually shortened by CAF, is a major determinant of ARP and that it is generally accepted that shortening of ARP favours re-entry.<sup>1,2</sup> Importantly, the role of  $I_{Ks}$  in determining the APD rises in prominence at increasing beating frequencies.<sup>9</sup> Indeed, fast pacing causes channel accumulation in closed states near the open state, and adrenergic stimulation alters  $I_{Ks}$  gating to further promote this accumulation.<sup>18,22</sup> Therefore, it could be possible that the shortening of the APD<sub>90</sub> here reported in CAF cells

driven at 1 Hz was greater in cells stimulated at high frequencies such as those reached during CAF. Moreover, there are data indicating that stable fast re-entry sources (rotors) occur with significantly higher rotation frequencies, lower conduction velocities, and shorter AP in cells with prominent  $I_{Ks}$ .<sup>23</sup> Finally, the frequency-dependent accumulation of  $I_{Ks}$  promotes post-repolarization refractoriness and fibrillatory conduction of waves emanating from rotors.<sup>23</sup> Therefore, it seems reasonable to propose that CAF-induced increase in  $\beta$ 1-Adrenoceptor-mediated effects on  $I_{Ks}$  could contribute to the long-term stabilization of the arrhythmia by shortening the ARP. The fact that  $\beta$ -adrenergic stimulation of  $I_{Ks}$  could contribute to AF was previously suggested by Sampson *et al.*<sup>24</sup> using a transgenic  $I_{Ks}$  channel mouse model. These investigators demonstrated that *in vivo* administration of isoproterenol predisposed  $I_{Ks}$  channel transgenic mice but not wild-type littermates that lack  $I_{Ks}$  to prolonged atrial arrhythmias. Furthermore, computational modelling revealed that  $\beta$ -Adrenoceptor stimulation-dependent accumulation of open  $I_{Ks}$  channels accounted for the pro-arrhythmic substrate.

On the other hand, CAF also produces an heterogeneous increase in sympathetic innervation<sup>25</sup> which, in turn, might heterogeneously increase  $\beta$ 1-Adrenoceptor stimulation, thus favouring repolarization heterogeneities within the atria. Additionally, up-regulation of  $\beta$ 1-Adrenoceptors in CAF myocytes would probably imply the enhancement of most of the  $\beta$ 1-Adrenoceptor-mediated deleterious effects including oxidative stress and fibrosis.<sup>10,19,26</sup> Moreover, it probably also alters intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and handling which in turn exert pro-arrhythmic (i.e. promoting triggered focal activity), pro-apoptotic, and pro-necrotic effects.

### 4.3 Study limitations

All samples came from atrial appendages which could not be representative of the rest of the atria. Moreover, due to the limited availability of LA samples, effects of isoproterenol on AP were only assessed in RAA cells. However, since CAF increases  $I_{Ks}$  density similarly in both atria<sup>8</sup> and isoproterenol more markedly increases  $I_{Ks}$  in the LA than in the RA, it seems reasonable to assume that isoproterenol also shortens APD in the LA. Furthermore, atrial remodelling may be influenced by pharmacological treatment, gender, and/or underlying cardiac diseases of the patients.<sup>1,2</sup> Patients with valvular and valvular combined with ischaemic heart disease or under beta-blocker therapy were equally distributed in both groups (Supplementary material online, Table S1). Moreover, multiple linear regression analysis confirmed that the only variable that influences the potentiation of the  $\beta$ 1-Adrenoceptor effects is the presence of CAF (Supplementary material online, Table S5). Furthermore, all experiments were carried out at room temperature, APs were recorded in isolated myocytes under current clamp conditions, and  $\beta$ 1-Adrenoceptors were stimulated using a synthetic catecholamine.

## 5. Conclusions

The present results demonstrate, for the first time, that CAF increases the effects of  $\beta$ 1-Adrenoceptor stimulation on human repolarizing currents preferentially in the LA. In CAF cells, isoproterenol further shortens the APD<sub>90</sub> as a consequence of the CAF-induced up-regulation of  $\beta$ 1-Adrenoceptors and derangements in ion channels. Therefore, it could be hypothesized that sympathetic stimulation further promotes re-entry, thus favouring AF maintenance.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

## Acknowledgements

We thank Lourdes Osuna for her invaluable technical assistance.

**Conflict of interest:** none declared.

## Funding

This work was supported by Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC-13, CNIC-08–2009), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2011-30088 and SAF2011-30112), Instituto de Salud Carlos III (Red HERACLES RD06/0009, PI08/0665, and PI11/01030), Comunidad Autónoma de Madrid (S2012/BMD-2374), and Sociedad Española de Cardiología grants.

## References

- Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 2011;**91**:265–325.
- Wakili R, Voigt N, Käb S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2011;**121**:2955–2968.
- Michael G, Xiao L, Qi XY, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2009;**81**: 491–499.
- Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward  $K^+$  current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;**80**:772–781.
- Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type  $Ca^{2+}$  currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999;**85**:428–436.
- Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T *et al.* The G protein-gated potassium current  $I_{KACH}$  is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005;**112**:3697–3706.
- Voigt N, Trausch A, Knaut M, Matschke K, Varró A, Van Wagoner DR *et al.* Left-to-right atrial inward rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;**3**:472–480.
- Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P *et al.* In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol* 2010;**55**:2346–2354.
- Stengl M, Volders PG, Thomsen MB, Spätsjens RL, Spido KR, Vos MA. Accumulation of slowly activating delayed rectifier potassium current ( $I_{Ks}$ ) in canine ventricular myocytes. *J Physiol* 2003;**551**:777–786.
- Workman AJ. Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2010;**381**:235–249.
- Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M *et al.* Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:15631–15636.
- Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:477–489.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:9–33.
- Marshall GE, Russell JA, Tellez JO, Hund PS, Currie S, Dempster J *et al.* Remodelling of human atrial  $K^+$  currents but not ion channel expression by chronic  $\beta$ -blockade. *Pflügers Arch* 2012;**463**:537–548.
- Li GR, Feng J, Wang Z, Ferrini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier  $K^+$  current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996;**78**:903–915.
- Terrenoire C, Clancy CE, Cormier JW, Sampson KJ, Kass RS. Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circ Res* 2005;**96**:e25–34.
- Walsh KB, Kass RS. Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science* 1988;**242**:67–69.
- Volders PG, Stengl M, van Opstal JM, Gerlach U, Spätsjens RL, Beekman JD *et al.* Probing the contribution of  $I_{Ks}$  to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation. *Circulation* 2003;**107**:2753–2760.
- Xiang YK. Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes. *Circ Res* 2011;**109**:231–244.
- Bolger AP, Sharma R, Li W, Leenarts M, Kalra PR, Kemp M *et al.* Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease. *Circulation* 2002;**106**:92–99.



21. Redpath CJ, Rankin AC, Kane KA, Workman AJ. Anti-adrenergic effects of endothelin on human atrial action potentials are potentially anti-arrhythmic. *J Mol Cell Cardiol* 2006;**40**:717–724.
22. O'Hara T, Rudy Y. Quantitative comparison of cardiac ventricular myocyte electrophysiology and response to drugs in human and non-human species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;**302**:H1023–H1030.
23. Muñoz V, Grzeda KR, Desplantez T, Pandit SV, Mironov S, Taffet SM et al. Adenoviral expression of  $I_{Ks}$  contributes to wavebreak and fibrillatory conduction in neonatal rat ventricular cardiomyocyte monolayers. *Circ Res* 2007;**101**:475–483.
24. Sampson KJ, Terrenoire C, Cervantes DO, Kaba RA, Peters NS, Kass RS. Adrenergic regulation of a key cardiac potassium channel can contribute to atrial fibrillation: evidence from an  $I_{Ks}$  transgenic mouse. *J Physiol* 2008;**586**:627–637.
25. Gould PA, Yü M, McLean C, Finch S, Marshall T, Lambert GW et al. Evidence for increased atrial sympathetic innervation in persistent human atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006;**29**:821–829.
26. Feldman DS, Carnes CA, Abraham WT, Bristow MR. Mechanisms of disease: beta-adrenergic receptors—alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;**2**:475–483.

## Supplemental Material

### Expanded Material and Methods

#### Patients and atrial appendage collection

The study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Gregorio Marañón (CNIC-13) and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Each patient gave written informed consent. Right (RAA) and left atrial appendage (LAA) samples were obtained from patients in sinus rhythm (SR) and with chronic atrial fibrillation (CAF) that underwent cardiac surgery. Patient history was used to collect several clinical data, including echocardiographic data and type and duration of the arrhythmia where appropriate. SR was confirmed from a pre-surgery 12 lead ECG. All patients included in the atrial fibrillation group were in CAF (>6 month at the time of surgery). Patients with documented paroxysmal atrial fibrillation were excluded. Pharmacological treatment and severity of heart failure (according to the New York Heart Association [NYHA] classification) were also determined. All these clinical data from patients whose samples were used for electrophysiological experiments or for the analysis of mRNA expression are summarized in Supplemental Tables 1 and 2, respectively.

#### Electrophysiological analysis

##### *Human atrial myocyte isolation*

Atrial myocytes were enzymatically isolated from RAA and LAA samples obtained from 36 patients in SR and from 32 patients with CAF following methods previously described<sup>1-3</sup>. Immediately after surgical excision, samples were placed into chilled Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode's solution containing (mM): NaCl 100, KCl 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 5, taurine 50, MOPS 5, and glucose 20 (pH 7.0 with NaOH) and supplemented with 2,3-

butanedione monoxime (30 mM), chopped into small pieces ( $\approx 1 \text{ mm}^3$ ), and washed 3 times for 3 minutes with Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode's solution. Tissue pieces were then changed to Ca<sup>2+</sup>-free solution containing 254 U/mL collagenase type I (Worthington, USA) and 0.5 mg/mL protease type XXIV (Sigma Chemical Co, United Kingdom) and gently stirred for 15 minutes. Afterwards, the Ca<sup>2+</sup> concentration was raised to 0.2 mM, and the tissue was stirred for 30 minutes more. Stirring was continued with Tyrode's solution (0.2 mM Ca<sup>2+</sup>) containing only collagenase until rod-shaped striated myocytes were seen ( $\approx 35$  minutes). During all these steps, solutions were continuously oxygenated with 100% O<sub>2</sub> at 37°C.

Myocytes were kept until use in a storage solution containing (mM): KCl 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, glucose 10, K-glutamate 70,  $\beta$ -hydroxybutyrate 10, taurine 10, EGTA 10, and albumin 1% (pH 7.4 with KOH). Myocytes were used for electrophysiological recordings within 8 h.

### *Recording techniques*

A small aliquot of cell suspension was placed in a 0.5 mL chamber mounted on the stage of an inverted microscope (Nikon TMS, Nikon Co., Japan). After settling to the bottom of the chamber, cells were perfused at 1 mL/min with external solution (see composition below). Currents were recorded at room temperature (21-23°C) using the whole cell patch-clamp technique using an Axopatch-200B patch clamp amplifier (Molecular Devices, USA).<sup>1-8</sup> Recording pipettes were pulled from 1.0 mm o.d. borosilicate capillary tubes (GD1, Narishige Co., Ltd, Japan) using a programmable patch micropipette puller (Model P-2000 Brown-Flaming, Sutter Instruments Co., USA) and were heat-polished with a microforge (Model MF-830, Narishige). Micropipette resistance was  $< 3.5 \text{ M}\Omega$  when filled with the internal solution and immersed in the

external solution. The capacitive transients elicited by symmetrical 10 mV pulses from 0 mV were recorded at 50 kHz (filtered at 10 kHz) for subsequent calculation of capacitance surface area, access resistance and input impedance. In all experiments, series resistance was compensated manually by using the series resistance compensation unit of the Axopatch amplifier, and usually  $\geq 80\%$  compensation was achieved. In myocytes from SR patients, mean peak maximum outward K<sup>+</sup> current amplitude at +50 mV, uncompensated access resistance, and capacitance averaged  $1009 \pm 63$  pA,  $3.0 \pm 0.2$  M $\Omega$ , and  $77.0 \pm 3.2$  pF (n=134), respectively. In myocytes from CAF patients, mean peak maximum outward K<sup>+</sup> current amplitude at +50 mV, uncompensated access resistance, and capacitance (Supplemental Fig. 1) averaged  $777 \pm 96$  pA ( $P < 0.05$  vs SR),  $2.8 \pm 0.3$  M $\Omega$  ( $P > 0.05$  vs SR), and  $112 \pm 4.6$  pF (n=139) ( $P < 0.001$  vs SR), respectively. Thus, under our experimental conditions no significant voltage errors ( $< 5$  mV) due to series resistance were expected with the micropipettes used. In all cases, currents were filtered at half the sampling frequency and stored on the hard disk of a computer for subsequent analysis. To record voltage-dependent outward K<sup>+</sup> currents, the external solution contained (mM): NaCl 140, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, glucose 10, nifedipine (1  $\mu$ M), and atropine (1  $\mu$ M) (pH 7.4 with NaOH). To determine the concentration-dependent effects of isoproterenol on the Ca<sup>2+</sup>-independent 4-aminopyridine (4-AP)-sensitive component of the transient outward current ( $I_{to1}$ ), the external solution was supplemented with 50  $\mu$ M 4-AP to inhibit the ultrarapid component of the delayed rectifier current ( $I_{Kur}$ ). To record the inward rectifier current ( $I_{K1}$ ), the external solution contained (mM): NaCl 120, KCl 20, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, 4-AP 1, glucose 10, nifedipine (1  $\mu$ M), glibenclamide (10  $\mu$ M), and atropine (1  $\mu$ M) (pH 7.4 with NaOH). In both cases, recording pipettes were filled with an internal solution containing (mM): K-aspartate 80, KCl 42, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10, MgATP 5,

phosphocreatine 3, HEPES 5, and EGTA 5 (pH 7.2 with KOH). To record the inward calcium current ( $I_{Ca,L}$ ) the external solution contained (mM): tetraethylammonium (TEA) 137,  $CaCl_2$  1,  $MgCl_2$  0.5, HEPES 10, and glucose 10 (pH=7.4 with CsOH), while the internal solution contained (mM): CsCl 125, TEA 20, EGTA 10, MgATP 5, phosphocreatine 3.6, and HEPES 10 (pH=7.2 with CsOH).

### *Recording of action potentials*

Action potentials were recorded using the current clamp configuration<sup>2</sup> in myocytes perfused with an external solution containing (mM): NaCl 150, KCl 4,  $MgCl_2$  2,  $CaCl_2$  2, glucose 10, and HEPES 10 (pH 7.4 with NaOH). Recording pipettes were filled with internal solution containing (mM): K-aspartate 100, NaCl 8, KCl 40, Mg-ATP 5, EGTA 5,  $CaCl_2$  2, GTP 0.1, and HEPES 10 (pH 7.4 with KOH). Tip resistance was  $>7\text{ M}\Omega$  to ensure high quality gigaseals and minimal depolarization of membrane potential. Action potentials were elicited by depolarizing current pulses of 2 ms in duration at 1.5 times the current threshold at a frequency of 1 Hz.

### *Pulse protocols and analysis*

The protocol to obtain current-voltage relationships of human atrial outward  $K^+$  currents consisted of 250-ms pulses from -80 mV to potentials ranging -90 mV and +50 mV.<sup>3</sup> A prepulse of 25 ms to -40 mV was applied to inactivate the inward  $Na^+$  current ( $I_{Na}$ ).  $I_{to1}$  was measured, in cells with the  $I_{to1}$ -predominant and intermediate patterns,<sup>3</sup> as the difference between the peak outward current and the current at the end of the pulse, whereas the fast-activating noninactivating component ( $I_{sus}$ ) was measured as the current at the end of the pulse in cells with  $I_{sus}$ -predominant and intermediate patterns.<sup>1,3,9,10</sup> In some experiments,  $I_{Kur}$  was measured at the end of 250-ms pulses as

the current resistant to 10 mM TEA and 1  $\mu$ M dofetilide. To obtain the inactivation curves of  $I_{\text{to1}}$  a two-pulse protocol was used. The first 250-ms conditioning pulse from –80 mV to potentials between –90 and +50 mV was followed by a test pulse to +50 mV. Inactivation curves were constructed by plotting the current amplitude obtained with the test pulse, as a function of the voltage command of the conditioning pulse and a Boltzmann function was fitted to the data to obtain the midpoint ( $V_h$ ) and the slope ( $k$ ) of the inactivation curve. To describe the time course of current decay, an exponential analysis was used. The slow component of the delayed rectifier current ( $I_{\text{Ks}}$ ) was recorded in all cell types by applying 4-s pulses from a holding potential of -40 mV to potentials ranging -40 and +60 mV and tail currents were elicited upon repolarization to –30 mV in cells previously superfused with 2 mM 4-AP.<sup>3,11</sup> Under these conditions,  $I_{\text{Ks}}$  amplitude was measured as the difference between the instantaneous current level after the decay of the capacity transient and the current level at the end of the pulse. The activation kinetics of  $I_{\text{Ks}}$  has been described as a sigmoidal process, assuming that the channel has multiple closed states.<sup>3,11</sup> However, in the present study and in order to describe the dominant time constant of this process, an exponential analysis was used as an operational approach, fitting the latter part of the activating current with a single exponential of the form:

$$y=A\exp(-t/\tau x)+C$$

where  $\tau$  is the system time constant, A is the amplitude of the exponential and C is the baseline value. Deactivation kinetics was also determined by fitting a monoexponential function to the traces of the deactivating tail currents recorded on repolarization to -30 mV after pulses to +60 mV. Activation curves of  $I_{\text{Ks}}$  were constructed by plotting the peak tail current amplitude at -30 mV, as a function of the voltage command of the preceding pulse and a Boltzmann function was fitted to the data to obtain the  $V_h$  and the

$k$  values of the activation curve. Voltage-dependence of activation and deactivation kinetics were not assessed in SR myocytes because tail current amplitudes were so small that they did not allow an accurate measurement.

The protocol to record human atrial  $I_{K1}$  consisted of 250-ms pulses from -120 to +20 mV.<sup>8</sup>  $I_{K1}$  amplitude was measured at the end of the pulse and the I-V curves were corrected according to the calculated liquid junction potential (LJP) of 12.1 mV at 20 mM  $[K^+]_o$ . In some experiments  $I_{K1}$  was also measured by applying 50-ms pulses from a holding potential of -80 mV to -100 mV followed by depolarizing ramps to +20 mV (800 ms).

The holding potential used when recording  $I_{Ca,L}$  was maintained at -80 mV and the cycle time for any protocol was 10 s. The protocol to obtain current-voltage relationships consisted of 500-ms pulses that were imposed in 5 mV increments between -40 and +50 mV. The  $I_{Na}$  was inactivated by the application of a 50-ms prepulse to -30 mV.

To obtain the  $EC_{50}$  (concentration that produces the half maximum response) and the Hill coefficient ( $n_H$ ), the effect produced by isoproterenol at various concentrations  $[D]$  was fitted to the equation:

$$f = E_{\min} + (E_{\max} - E_{\min}) / \{1 + (EC_{50}/[D])^{n_H}\}.$$

## Drugs

Isoproterenol, atropine, 4-AP, TEA, 9-cyclopentyladenine (CPA), PKI and nifedipine were purchased from Sigma, whereas dofetilide and HMR-1556 were kindly provided by Pfizer (United Kingdom) and Sanofi Aventis (France), respectively. All these compounds were dissolved as appropriate to yield 0.01 M stock solutions. Stock solutions of isoproterenol were prepared fresh daily in deionised water containing

0.04% ascorbic acid. Further dilutions were carried out in external solution to obtain the desired final concentration. Control solutions always contained the same solvent concentrations as the test solution.

### **Mathematical model of a human atrial action potential**

To simulate the shapes of human atrial action potentials, we employed a well-established mathematical model,<sup>12</sup> previously used for simulating the effects of adrenergic stimulation on atrial action potentials.<sup>13</sup> This model allows to obtain three types of action potentials with different morphologies reproducing the described action potential heterogeneity within the human atria. For our simulations we selected type 3 action potential model, which is characterized by a triangular shape, because its morphology is almost identical to that of the APs we recorded experimentally (Figure 6E). CAF-remodeled type 3 action potentials were obtained as described by Courtemanche et al, i.e., considering a 70% reduction in  $I_{CaL}$  and a 50% reduction in  $I_{to1}$  and  $I_{Kur}$ .<sup>12</sup> Moreover, we further included other changes (100% increase in  $I_{Ks}$  and  $I_{K1}$ ) to take into consideration CAF-induced modifications in ionic currents that have been described after the model had been published.<sup>3,14</sup>

The time derivative of the membrane potential  $V_m$  is given by:

$$dV_m/dt = -(I_{ion} + I_{st})/C_m$$

where  $I_{ion} = I_{Na} + I_{Ca,L} + I_{to1} + I_{Kur} + I_{Kr} + I_{Ks} + I_{K1} + I_{b,Ca} + I_{b,Na} + I_{NaCa} + I_{p,Ca} + I_{Na,K}$ ,  $I_{st}$  is the stimulus current, and  $C_m$  is the membrane capacitance. The model was implemented using MinGW GCC compiler for SR and CAF-modified conditions at pacing frequencies of 1 Hz. Afterwards, it was then run in each condition (SR and CAF) considering the experimentally measured effects of 1 nM isoproterenol on  $I_{to1}$ ,  $I_{Ks}$ , and  $I_{CaL}$  recorded in



RAA cells by reducing ( $I_{to1}$ ) or increasing ( $I_{Ks}$  and  $I_{CaL}$ ) the maximal conductance of each current. Indeed, to simulate the effects of isoproterenol,  $I_{to1}$  conductance was reduced by 10.6% in SR and by 28.7% in CAF,  $I_{Ks}$  conductance was increased by 30.0% and 52.0% in SR and CAF, respectively, and finally,  $I_{CaL}$  conductance was increased by 13.5% in SR and by 24.1% in CAF. Moreover, the effects of 1 nM isoproterenol on the activation kinetics and the voltage-dependence of activation of  $I_{Ks}$  were also introduced in the model. The effects of isoproterenol on  $I_{K1}$  were not considered since they only appeared at potentials negative to the  $E_K$ . To confirm that the CAF-induced increase of  $I_{Ks}$  determines the shortening produced by isoproterenol in CAF cells, the effects of isoproterenol were simulated in a model in which all the CAF-induced modifications were introduced except the  $I_{Ks}$  increase.

### **Mathematical model of $I_{Ks}$**

$I_{Ks}$  was simulated by using a model formulation previously described and used for simulating the effects of adrenergic stimulation on this current.<sup>13,15</sup> The model was implemented using Matlab (Mathworks Co., Natick, MA, USA) for SR and CAF-modified conditions at pacing frequencies of 0.05 and 1 Hz. In both cases, parameters affecting current activation and deactivation kinetics were adjusted to reproduce experimental data. Furthermore, CAF-remodeled  $I_{Ks}$  was obtained by considering a 100% increase in its density as previously demonstrated.<sup>3</sup> Afterwards, the model was run in each condition (SR and CAF) considering the experimentally measured effects of 1 nM isoproterenol on  $I_{Ks}$  by increasing its maximal conductance by 30.0% and 52.0% in SR and CAF, respectively. Moreover, the effects of isoproterenol on the activation kinetics and on the voltage dependence of activation were also introduced in the model.

### **Analysis of the mRNA expression**

### *Tissue and RNA preparation*

Total RNA was isolated from human atrial appendages obtained from 5 patients in SR and from 5 patients with CAF following previously described methods.<sup>3</sup> Immediately after the surgical excision, tissue samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further processing. Total RNA was purified from the homogenized tissue specimens (homogenizer Ultra Turrax T18 IKA, Germany) with RNeasy midi kit (Qiagen, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified by photometry ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) and the purity of the samples was verified by the 260/280 ratio with a Nano-Drop 2000 (Thermo Scientific, USA).

### *Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)*

RT-PCR was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit following manufacturer instructions (Applied Biosystems, USA). The resulting cDNA template was subjected to real-time quantitative PCR (qPCR) using Taqman-based ABI gene expression assays, TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (ABI) and the StepOne real-time thermocycler engine (ABI). Gene expression analysis was performed using the TaqMan Gene Expression Assays Hs02330048\_s1, Hs00766287\_m1, Hs00209600\_m1, Hs01012698\_m1 and Hs01579625\_m1 for target gene  $\beta$ 1-adrenergic receptor (ADRB1, *Homo sapiens*  $\beta$ 1-adrenoceptor), adenylate cyclases 5 and 6 and phosphodiesterases 3A and 4D, respectively and the eukaryotic 18S rRNA endogenous control was used as the normalization gene. Each sample was run in triplicates and non-template control to test for contamination of assay reagents was also included in the plate. Moreover, three types of controls aimed at detecting genomic DNA contamination in the RNA sample or during the RT or qPCR reactions were always included: a RT mixture without reverse transcriptase, a RT mixture including the

enzyme but no RNA, negative control (reaction mixture without cDNA template). The data were collected and analyzed using One-Step Software (ABI). The obtained cycle to threshold (Ct) values were normalized to the 18S rRNA. The Ct values are based on a log scale and were transformed to delta Ct ( $\Delta$ Ct) values by subtracting the value corresponding to the gene of interest from that of 18S. To compare RAA vs LAA expression differences, the respective data were transformed from  $\Delta$ Ct values to equivalent fold differences using the following equation, previously used for the same purposes:<sup>16</sup>  $\text{Fold Difference (mean } \Delta\text{Ct}_{\text{LAA}} - \text{mean } \Delta\text{Ct}_{\text{RAA}}) = 2^{(\text{mean } \Delta\text{Ct}_{\text{LAA}} - \text{mean } \Delta\text{Ct}_{\text{RAA}})}$ . To determine differences between expression in samples from patients with CAF and those from patients in SR the equation was:  $\text{Fold Difference (mean } \Delta\text{Ct}_{\text{SR}} - \text{mean } \Delta\text{Ct}_{\text{CAF}}) = 2^{(\text{mean } \Delta\text{Ct}_{\text{SR}} - \text{mean } \Delta\text{Ct}_{\text{CAF}})}$ . The standard errors were omitted due to transformation of the data and the subsequent loss of meaning.<sup>16</sup>

### Statistical methods

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Student *t*-test or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test were used to assess statistical significance where appropriate. Comparisons between categorical variables were done using Fisher's exact test. A value of  $P < 0.05$  was considered significant. A multiple linear regression was used to identify putative associations between isoproterenol induced effects on the  $I_{to1}$ ,  $I_{Ks}$ , and  $I_{K1}$  and some clinical characteristics or pharmacological treatments of the patients. For the analysis 7 variables were considered including: age, gender, presence or absence of CAF, ejection fraction, NYHA functional class (III and IV), and treatment with beta blockers and with ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers (Supplemental Table 5). To make comparisons between two different concentration-response curves, an F-test was used.

## Supplemental results

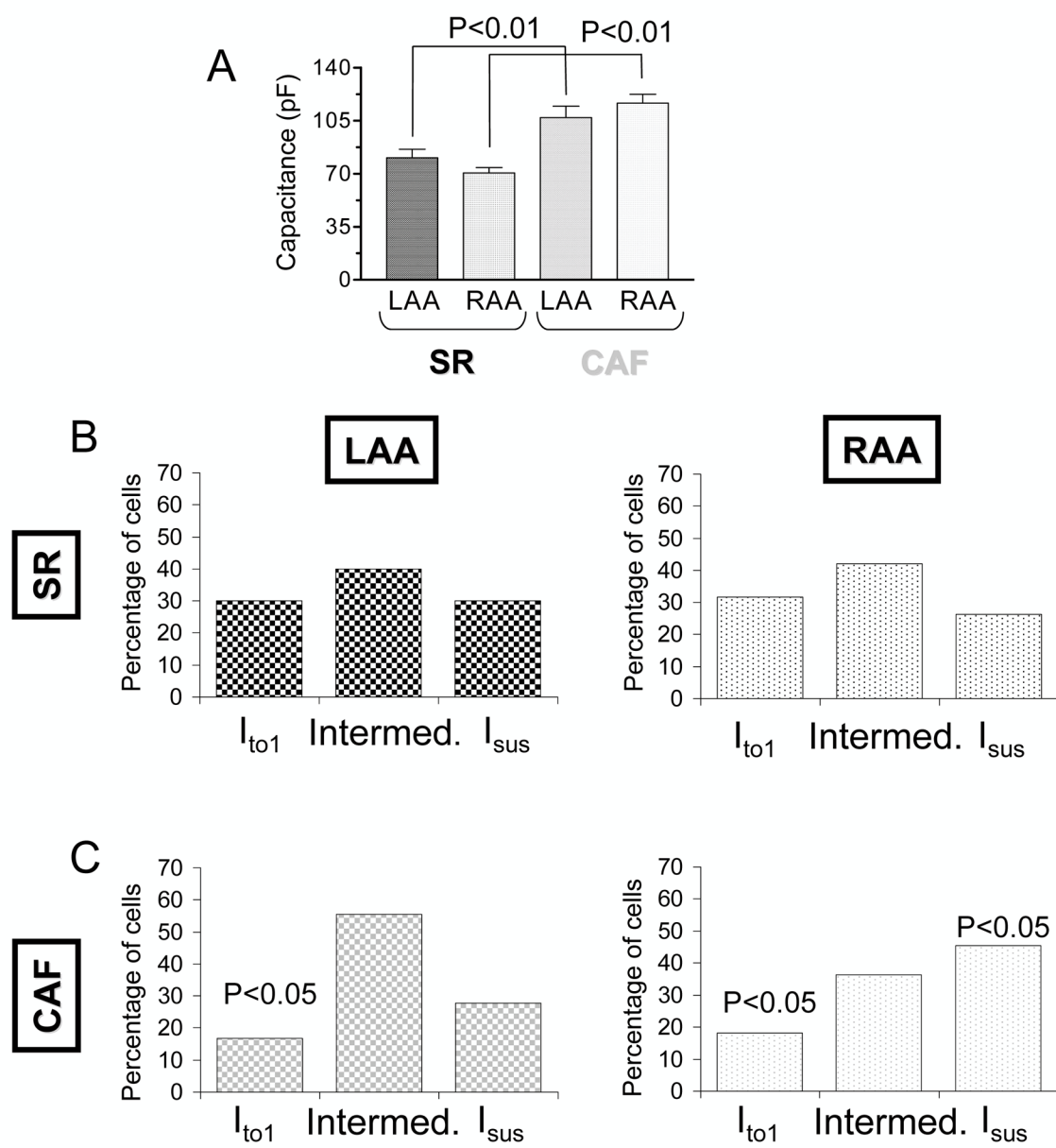
### **Supplemental Figure 1. Cell capacitances and types of cells according the predominant K<sup>+</sup> current during plateau.**

A, Bar graph showing mean capacitance values of LAA and RAA myocytes obtained from SR and CAF patients. B and C, Bar graphs showing the percentage of cells that exhibited I<sub>to1</sub>-predominant, I<sub>sus</sub>-predominant, and intermediate patterns in SR (B) and CAF (C) myocytes.

Panel A shows that capacitance values were significantly greater (P<0.01) in CAF than in SR myocytes, both in RAA and LAA myocytes (n=234). However, in both SR and CAF, capacitance of LAA myocytes was indistinguishable from RAA myocytes.

To develop the experiments of this paper we randomly selected and patched 234 rod-shaped healthy myocytes. Under these conditions we confirmed what we demonstrated previously,<sup>3</sup> that considering the main K<sup>+</sup> current elicited at plateau potentials three types of cells can be differentiated. Panel B shows that about ≈30% of the LAA and RAA myocytes from SR patients exhibited an outward current mainly composed of a fast activating and inactivating component. In these cells the amplitude of the sustained component recorded at the end of the pulse was ≈20% of the peak amplitude. Therefore, the main repolarizing current during the plateau phase in these cells was the I<sub>to1</sub> and they were classified as I<sub>to1</sub>-predominant. I<sub>to1</sub> was completely absent in ≈30% of LAA and RAA cells from SR patients, in which a fast-activating non-inactivating component was recorded (I<sub>sus</sub>-predominant). In I<sub>sus</sub>-predominant cells, the current amplitude at the end of the depolarizing pulses was ≈85% of the peak current. Finally, in ≈40% of SR cells an intermediate pattern was detected, i.e., they exhibited both an I<sub>to1</sub> and a sustained component that represented >50% of the peak current (intermediate cells). Panel C shows the percentage of each myocyte type found in LAA and RAA samples from CAF

patients. In the LAA, we found a significant decrease in the percentage of  $I_{to1}$ -predominant cells which was accompanied by an increase in the percentage of cells that exhibited the intermediate pattern. In the RAA, CAF also significantly decreased the percentage of  $I_{to1}$ -predominant cells which, in this case, was accompanied by a significant increase in the  $I_{sus}$ -predominant type. Due to these changes, in CAF patients cell types were not equally distributed in the RAA and LAA.

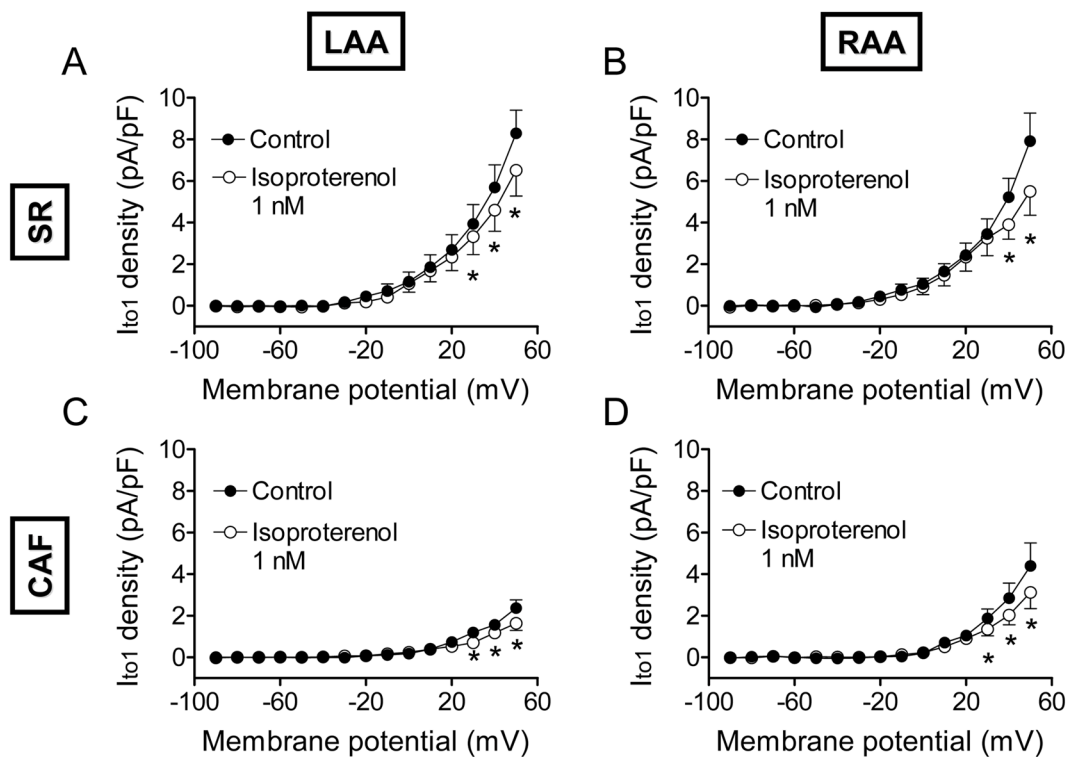


Supplemental Figure 1

**Supplemental Figure 2. Effects of isoproterenol on  $I_{to1}$ .** Mean current density-voltage relationships for  $I_{to1}$  recorded in LAA (A and C) and RAA (B and D) myocytes obtained from SR (A and B) and CAF (C and D) patients in the presence and absence of 1 nM isoproterenol. \* $P < 0.05$  vs control.

The protocol to obtain current-voltage relationships of  $I_{to1}$  consisted of 250-ms pulses from -80 mV to potentials ranging -90 mV and +50 mV.  $I_{to1}$  amplitude was measured as the difference between the peak current and the current at the end of the 250-ms pulse in those cells that exhibited intermediate and  $I_{to1}$ -predominant patterns.  $I_{to1}$  density was calculated on each cell by normalizing the current amplitude by the capacitance. Confirming previous results,<sup>3</sup> in SR patients there were no differences in  $I_{to1}$  density between LAA and RAA myocytes ( $3.9 \pm 0.9$  pA/pF vs  $3.4 \pm 0.7$  pA/pF at +30 mV,  $n = 16$ ,  $P > 0.05$ ) (Panels A and B). CAF significantly decreased  $I_{to1}$  density, an effect that was significantly greater in the LAA than in the RAA ( $1.2 \pm 0.1$  pA/pF vs  $1.9 \pm 0.4$  pA/pF at +30 mV,  $n = 16$ ,  $P < 0.05$ ) (Panels C and D).

In SR patients, isoproterenol significantly decreased  $I_{to1}$  density at potentials positive to +20 and +30 mV in the LAA and the RAA, respectively. In CAF myocytes, isoproterenol significantly decreased current density at potentials positive to +20 mV in both atria. Moreover, this inhibition was significantly more marked in CAF than in SR cells and significantly greater in LAA than in RAA myocytes.



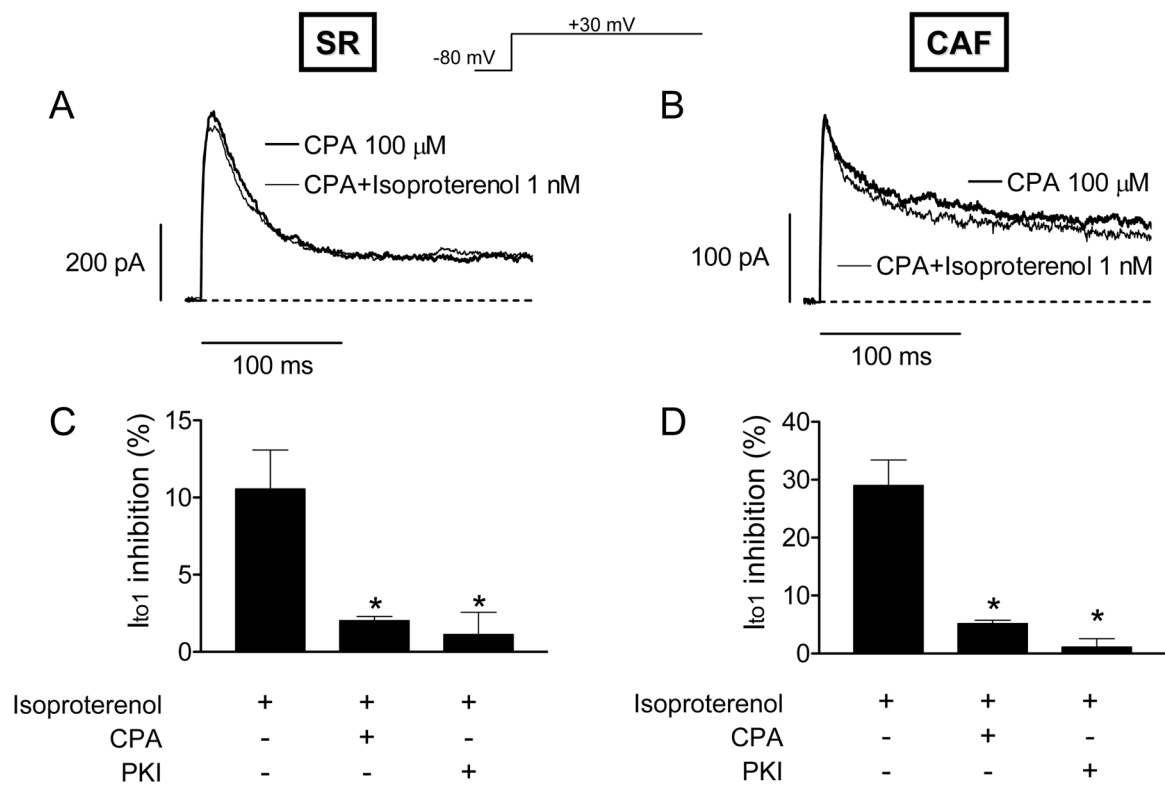
Supplemental Figure 2



**Supplemental Figure 3. Signalling pathway involved in the isoproterenol-induced**

**I<sub>to1</sub> inhibition.** I<sub>to1</sub> traces elicited by applying 250-ms pulses from -80 to +30 mV in RAA cells from an SR (A) and a CAF (B) patient in the presence of 100  $\mu$ M CPA alone or plus isoproterenol. Percentage of isoproterenol-induced I<sub>to1</sub>-inhibition at +30 mV in SR (C) and CAF (D) cells in the presence and absence of CPA and of a specific protein kinase A inhibitor (PKI, 1  $\mu$ M). \* P<0.05 vs cells perfused with isoproterenol alone.

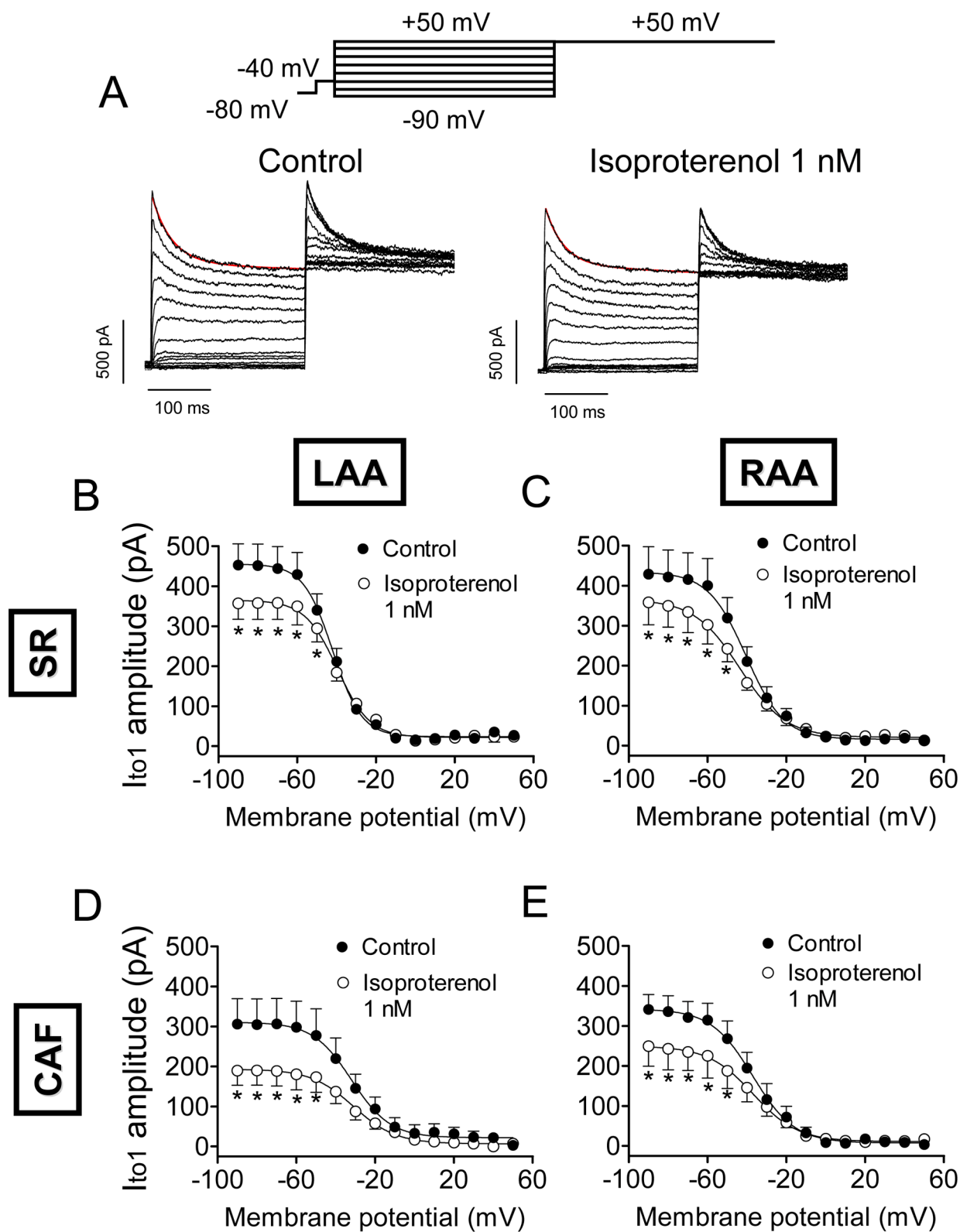
Isoproterenol-induced cardiac I<sub>to1</sub> inhibition has not been reported before in any species, thus, we investigated whether the canonical  $\beta$ 1-adrenoceptor signalling pathway which involves AC and PKA, was responsible for the observed effects. Perfusion of SR and CAF myocytes with CPA, a membrane permeable AC inhibitor, slightly decreased current amplitude ( $15.2 \pm 3.6\%$ ), without modifying the time course of inactivation. Importantly, in the presence of CPA, isoproterenol did not further modify I<sub>to1</sub> amplitude both in SR (A and C) and CAF cells (B and D). To determine the involvement of PKA, the effects of isoproterenol on the I<sub>to1</sub> were studied in the presence of PKI, which was added into the internal solution. In the presence of PKI, which did not modify either the current amplitude or the inactivation kinetics, isoproterenol decreased the current by  $1.1 \pm 1.4\%$  and  $0.9 \pm 0.7\%$  in SR and CAF cells, contrasting with the  $10.5 \pm 2.5$  and  $28.7 \pm 1.2\%$  produced by isoproterenol alone (P<0.05). Thus, these results strongly suggest that  $\beta$ 1-adrenoceptor stimulation inhibits I<sub>to1</sub> by means of the sequential activation of AC and PKA both in SR and CAF cells.



**Supplemental Figure 4. Effects of isoproterenol on the voltage-dependence of  $I_{to1}$**

**inactivation. A.** Outward  $K^+$  current traces recorded in a LAA myocyte isolated from an SR patient by applying 250-ms pulses from -80 mV to potentials ranging -90 mV and +50 mV followed by a test pulse to +50 mV in the absence and presence of 1 nM isoproterenol. Red lines represent the fit of a biexponential function to the current traces recorded at +50 mV. **B-E,** Mean inactivation curves for  $I_{to1}$  recorded in LAA (B and D) and RAA (C and E) myocytes obtained from SR (B and C) and CAF (D and E) patients in the presence and absence of 1 nM isoproterenol. \* $P < 0.05$  vs control. A Boltzmann equation was fitted to the data (continuous lines).

$I_{to1}$  inactivation curves were constructed by plotting peak current amplitude generated by the test pulse to +50 mV as a function of the voltage of the conditioning pulse in the absence and presence of isoproterenol. Isoproterenol significantly decreased the current amplitude at +50 mV after pulses to potentials ranging -90 and -50 mV without modifying the midpoint of inactivation ( $V_h$ ) or the slope values ( $k$ ) in any case (Supplemental Table 3).

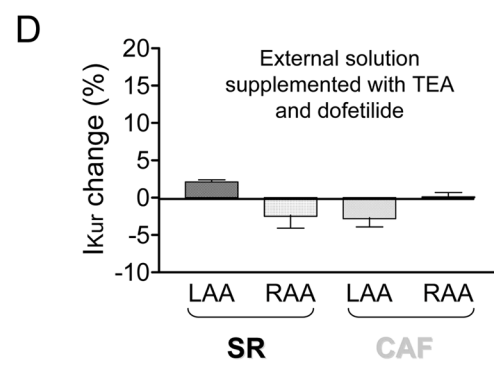
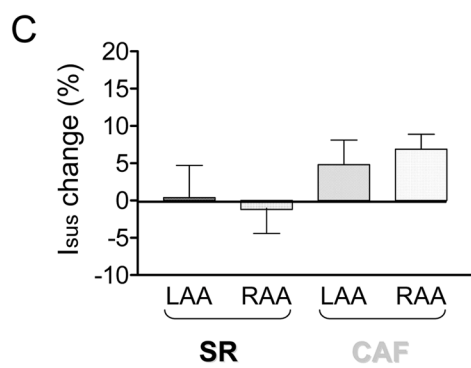
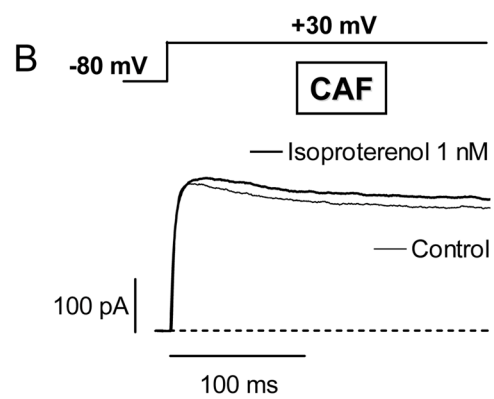
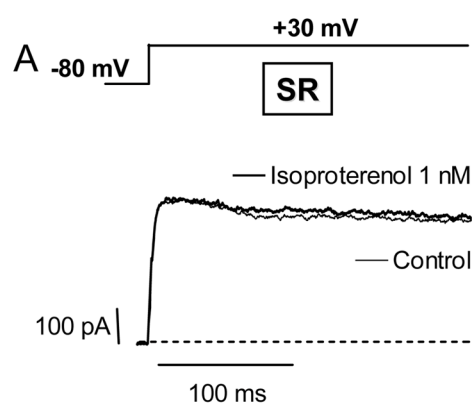


Supplemental Figure 4

**Supplemental Figure 5. Isoproterenol (1 nM) does not modify the  $I_{\text{sus}}$ .**

(A and B) Outward K<sup>+</sup> currents recorded in  $I_{\text{sus}}$ -predominant RAA cells obtained from an SR (A) and a CAF (B) patient by applying 250-ms pulses from -80 to +30 mV in control conditions and in the presence of isoproterenol. (C and D) Bar graph showing the percentage of  $I_{\text{sus}}$  (C) and  $I_{\text{Kur}}$  (D) change at +30 mV induced by isoproterenol on LAA and RAA cells from SR and CAF patients.  $I_{\text{Kur}}$  was measured at the end of the pulse as the current insensitive to TEA and dofetilide. Each point represents the mean $\pm$ SEM of n>10.

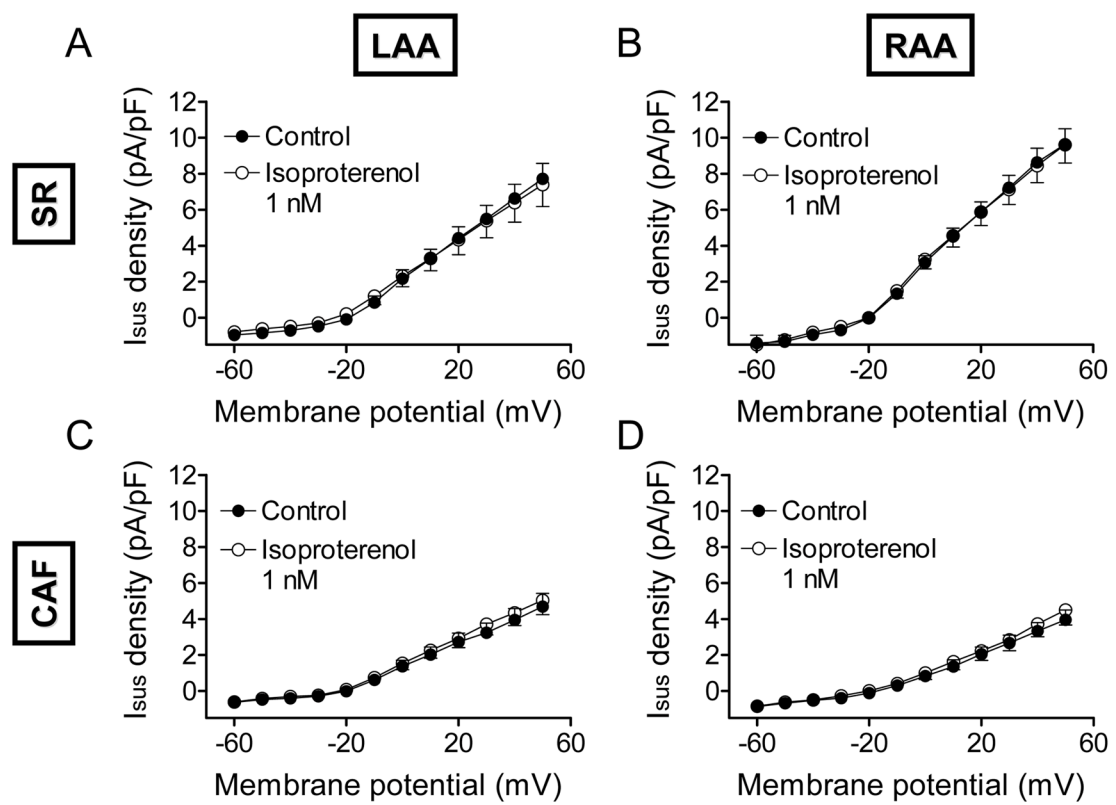
Supplemental Figures 5A and B show the effects of isoproterenol (1 nM) in  $I_{\text{sus}}$ -predominant RAA cells obtained from an SR and a CAF patient, respectively. Isoproterenol, at 1 nM, did not significantly modify  $I_{\text{sus}}$  recorded either in SR or CAF cells (Supplemental Figure 5C). Since  $I_{\text{sus}}$  is mainly (~70%) carried by the  $I_{\text{Kur}}$ ,<sup>3</sup> we next determined the effects of isoproterenol on the  $I_{\text{Kur}}$ . Treatment of  $I_{\text{sus}}$ -predominant and intermediate pattern cells with 10 mM tetraethylammonium (TEA) and 1  $\mu$ M dofetilide leaves  $I_{\text{Kur}}$  unaffected.<sup>3</sup> Thus, we further analyzed the effects of isoproterenol on  $I_{\text{Kur}}$  measured as the TEA+dofetilide-resistant current (Supplemental Figure 5D). Under these conditions, isoproterenol did not modify the  $I_{\text{Kur}}$  recorded in SR and CAF myocytes.



Supplemental Figure 5

**Supplemental Figure 6. Effects of isoproterenol on the  $I_{\text{sus}}$ .** Mean current density-voltage relationships for  $I_{\text{sus}}$  recorded in LAA (A and C) and RAA (B and D) myocytes obtained from SR (A and B) and CAF (C and D) patients in the presence and absence of 1 nM isoproterenol.

The protocol to obtain current-voltage relationships of  $I_{\text{sus}}$  consisted of 250-ms pulses from -80 mV to potentials ranging -90 mV and +50 mV.  $I_{\text{sus}}$  amplitude was measured at the end of 250-ms pulses in cells with intermediate and  $I_{\text{sus}}$ -predominant patterns. In SR patients,  $I_{\text{sus}}$  density was significantly greater in RAA than in LAA cells ( $7.2 \pm 0.7$  vs  $5.5 \pm 0.7$  pA/pF at +30 mV,  $n=24$ ,  $P<0.05$ ). In CAF patients,  $I_{\text{sus}}$  density significantly decreased in both RAA and LAA cells, this decrease being more marked in the RAA than in the LAA. As a consequence,  $I_{\text{sus}}$  density was undistinguishable in both atria ( $3.0 \pm 0.4$  pA/pF at +30 mV,  $n=20$ ,  $P<0.05$  vs SR). Isoproterenol did not significantly modify the  $I_{\text{sus}}$  density in RAA and LAA cells from both SR and CAF patients at any of the voltages tested.

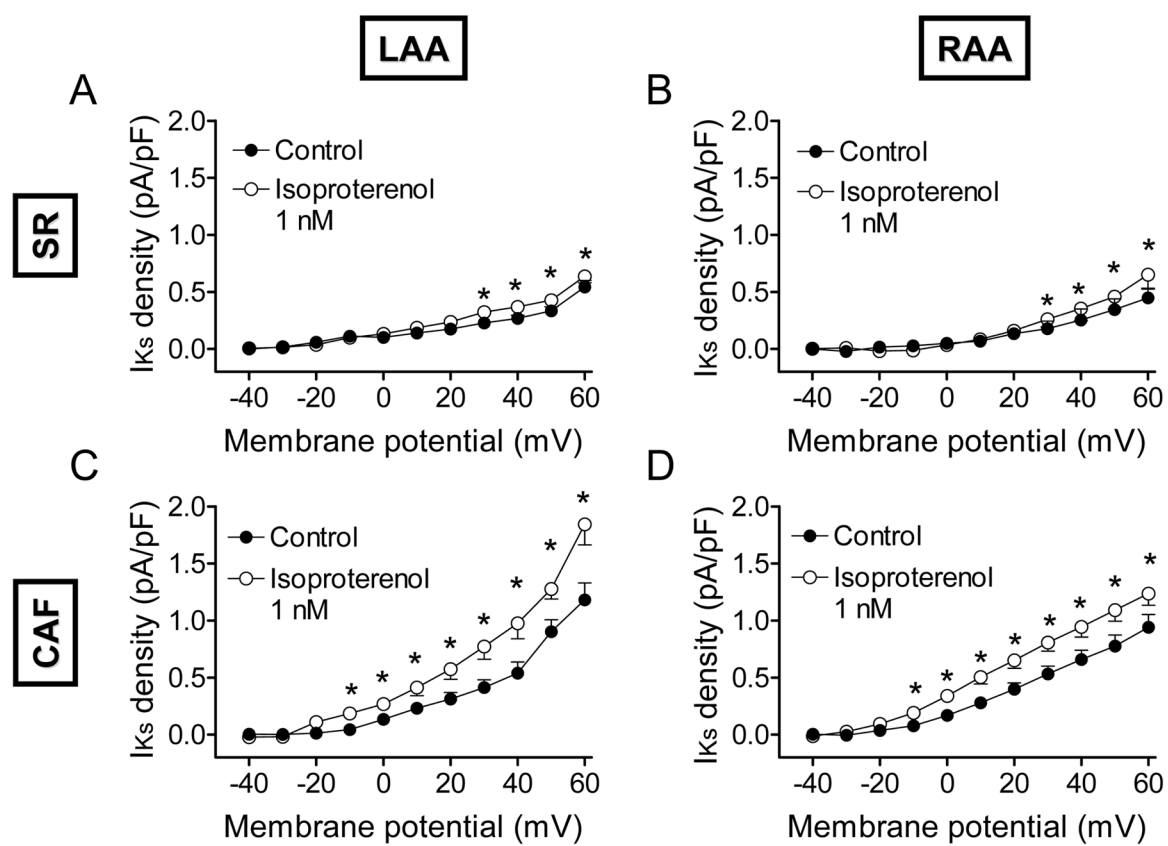


Supplemental Figure 6



**Supplemental Figure 7. Effects of isoproterenol on the  $I_{Ks}$ .** Mean current density-voltage relationships for  $I_{Ks}$  recorded in LAA (A and C) and RAA (B and D) myocytes obtained from SR (A and B) and CAF (C and D) patients in the presence and absence of 1 nM isoproterenol. \* $P < 0.05$  vs control.

$I_{Ks}$  was recorded by applying 4-s pulses from a holding potential of -40 mV to potentials ranging -40 and +60 mV in cells previously superfused with 2 mM 4-AP. The 4-AP-resistant component amplitude (measured as the difference between the amplitude at the end and the beginning of the pulse) was small in SR cells. Therefore, the 4-AP-resistant current density, which was indistinguishable between RAA and LAA cells, was low ( $0.2 \pm 0.03$  pA/pF at +30 mV,  $n=16$ ). As can be observed, CAF increased density of the 4-AP-resistant current in both atria 2.5 fold ( $0.5 \pm 0.06$  pA/pF at +30 mV,  $n=30$ ,  $P < 0.01$  vs SR). In SR myocytes, isoproterenol increased the 4-AP-resistant current density at potentials positive to +20 mV and accelerated its activation kinetics (Supplemental Table 4 and supplemental Figure 8). In CAF myocytes isoproterenol increased  $I_{Ks}$  density at membrane potentials  $> -20$  mV. Therefore, the isoproterenol induced increase was significantly greater in CAF than in SR myocytes and in LAA than in RAA CAF cells.

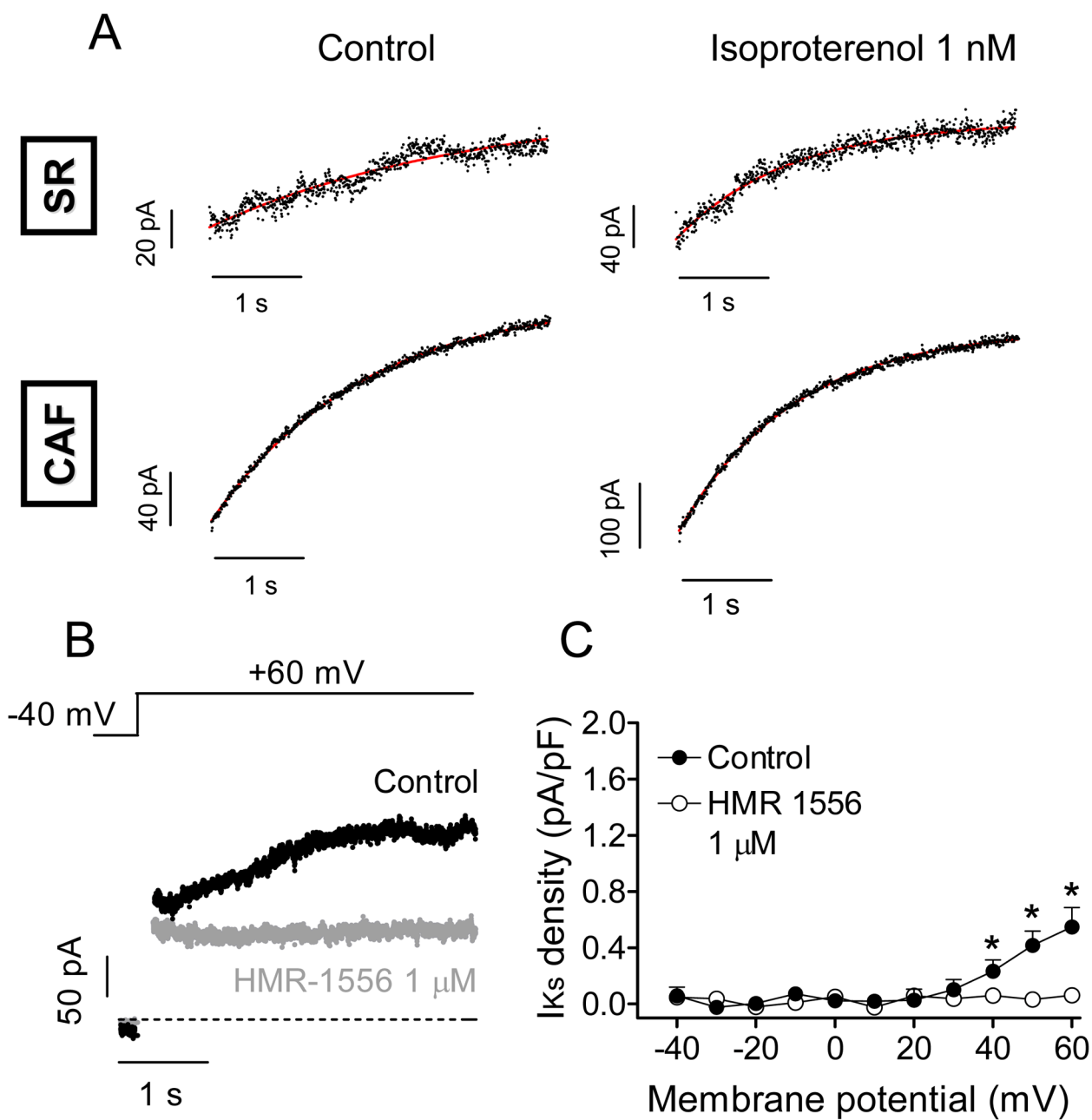


Supplemental Figure 7

**Supplemental Figure 8. Effects of isoproterenol on I<sub>Ks</sub> activation kinetics and of HMR-1556 on I<sub>Ks</sub> recorded in SR cells.**

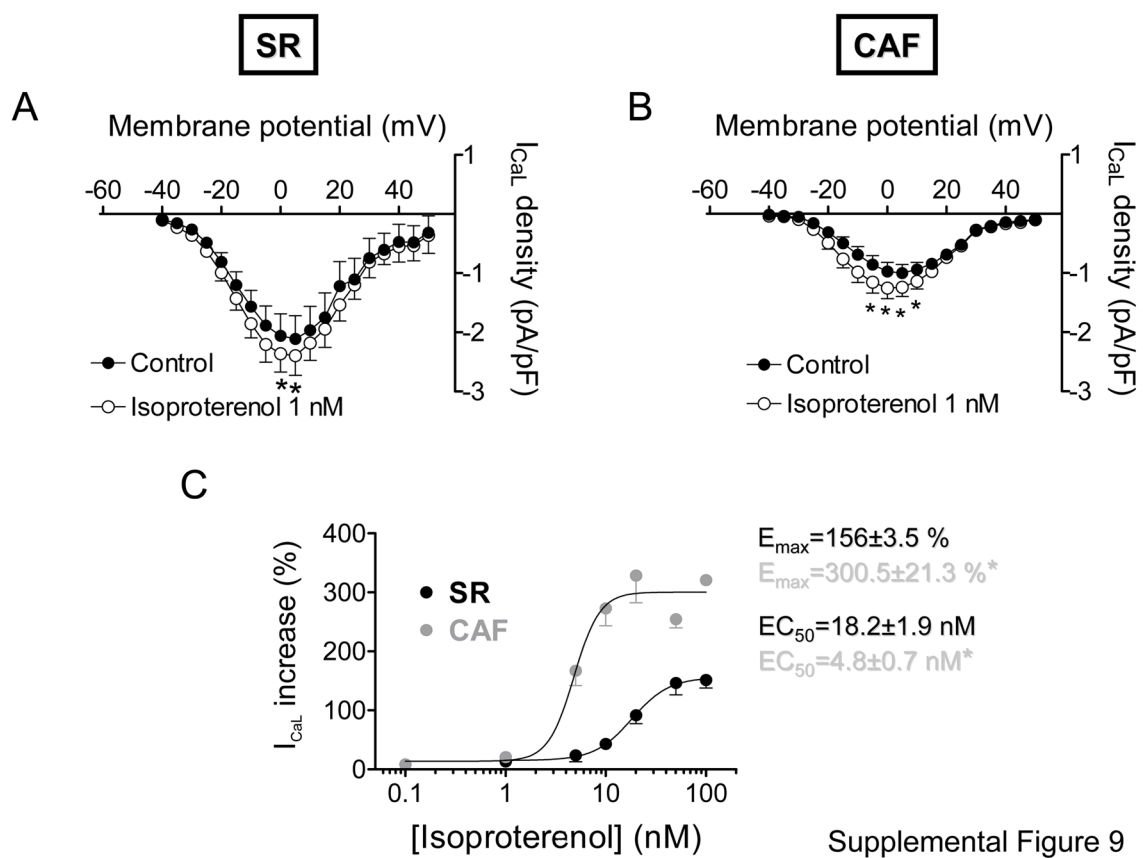
**A.** 2 mM 4-AP-resistant K<sup>+</sup> currents recorded in two RAA cells obtained from an SR (top) and a CAF (bottom) patient by applying 4-s pulses from a holding potential of -40 mV to +60 mV in the presence and absence of 1 nM isoproterenol. Continuous lines (red) represent the fit of an exponential function to the current traces. **B.** 2 mM 4-AP-resistant K<sup>+</sup> currents recorded in a RAA cell from an SR patient in the absence and presence of 1  $\mu$ M HMR-1556. **C.** Current-voltage relationships for 2 mM 4-AP-resistant K<sup>+</sup> currents recorded in RAA cells isolated from SR patients in the absence and presence of 1  $\mu$ M HMR-1556. In C, symbols represent the mean $\pm$ SEM of 7 experiments. \* P<0.05 vs Control.

As can be observed, in panel A, isoproterenol increased the 4-AP-resistant current density at +60 mV and accelerated the time course of the activation process both in SR and CAF myocytes. The results shown in Panels B and C demonstrate that the time-dependent component of the 4-AP resistant current recorded in RAA cells from SR patients was completely inhibited by HMR-1556, confirming that this current was indeed I<sub>Ks</sub>.



Supplemental Figure 8

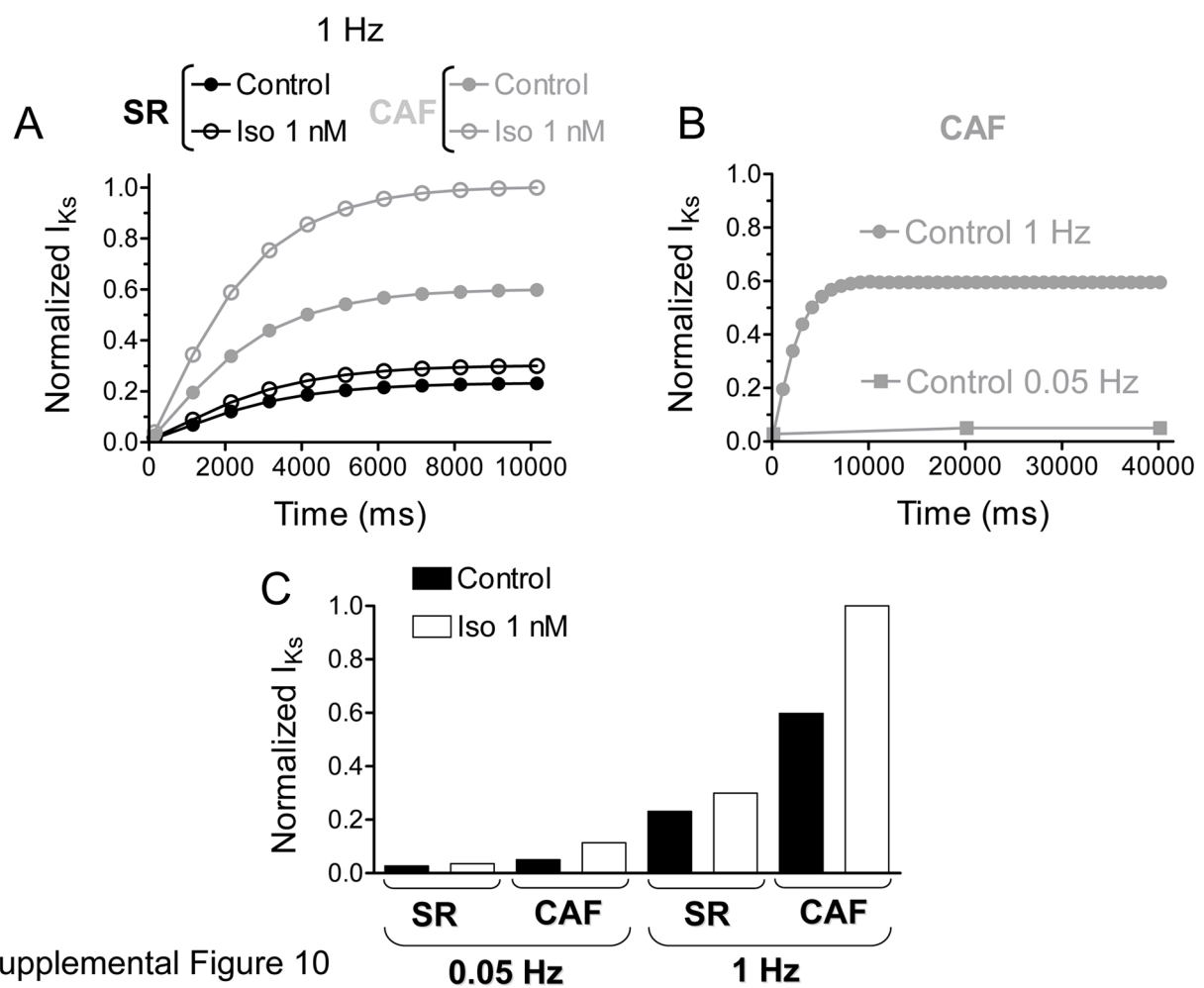
**Supplemental Figure 9. Effects of isoproterenol on  $I_{CaL}$ .** Mean current density-voltage relationships for  $I_{CaL}$  recorded in RAA myocytes obtained from SR (A) and CAF (B) patients in the presence and absence of 1 nM isoproterenol. \* $P < 0.05$  vs control. The protocol to obtain current-voltage relationships of  $I_{CaL}$  consisted of 500-ms pulses that were imposed in 5 mV increments between -40 and +50 mV. C. Percentage of isoproterenol-induced  $I_{CaL}$  increase at +5 mV in RAA myocytes from SR and CAF patients. Continuous lines represent the fit of a Hill equation to the data. \* $P < 0.05$  vs SR. Data in panels A and B demonstrated that  $I_{CaL}$  density was significantly lower in CAF ( $-0.97 \pm 0.2$  pA/pF at +5 mV,  $n=10$ ) than in SR ( $-2.1 \pm 0.4$  pA/pF at +5 mV,  $p < 0.01$ ,  $n=10$ ) myocytes, confirming previous results from other laboratories.<sup>17</sup> In myocytes from both SR and CAF patients, isoproterenol significantly increased peak  $I_{CaL}$  density. Interestingly, the augmentation induced by 1 nM isoproterenol was significantly more marked in CAF ( $24.1 \pm 3.1$  % at +5 mV) than in SR ( $13.5 \pm 1.6$  % at +5 mV,  $P < 0.05$ ) cells. To further analyze the concentration dependence of the isoproterenol increasing effects, panel C shows the percentage of isoproterenol-induced increase as a function of the isoproterenol concentration. The results demonstrated that  $I_{CaL}$  is very sensitive to  $\beta_1$ -adrenergic stimulation and that effects of isoproterenol were significantly more marked in CAF than in SR myocytes. Similar results were reported by Van Wagoner and coworkers when analyzing the effects of a single isoproterenol concentration (1  $\mu$ M) on SR and CAF myocytes.<sup>17</sup> Conversely, in another study, isoproterenol (also at 1  $\mu$ M) exhibited similar potency to increase  $I_{CaL}$  in CAF and SR myocytes.<sup>18</sup> The reasons for this discrepancy are unknown, even when our results point to a potentiation of the  $\beta$ -adrenergic effects in all cardiac currents studied so far.



Supplemental Figure 9

**Supplemental Figure 10. Mathematical model of  $I_{Ks}$ .** **A**, Normalized density of simulated  $I_{Ks}$  obtained by applying trains of 150-ms pulses from -80 to +30 mV at a pacing frequency of 1 Hz for SR and CAF-modified conditions in the absence and presence of 1 nM isoproterenol plotted as a function of time.  $I_{Ks}$  was simulated by using a model formulation previously described by Terrenoire *et al.*<sup>15</sup> Current density was normalized to the maximum current density obtained for CAF conditions in the presence of isoproterenol. **B**, Normalized density (relative to maximum current density obtained for CAF conditions in the presence of isoproterenol) of simulated  $I_{Ks}$  obtained by applying trains of 150-ms pulses from -80 to +30 mV at pacing frequencies of 0.05 and 1 Hz for CAF conditions. **C**, Effects of 1 nM isoproterenol on simulated steady-state  $I_{Ks}$  (measured at the end of trains of 150-ms pulses from -80 to +30 mV) at pacing frequencies of 0.05 and 1 Hz for SR and CAF conditions.

As can be observed in panel A,  $I_{Ks}$  density progressively increased during repetitive stimulation with 150-ms pulses to +30 mV applied at 1 Hz, both in SR and CAF conditions. Importantly, accumulation of the current, and thus steady-state  $I_{Ks}$  density, was more marked in CAF than in SR and in the presence than in the absence of 1 nM isoproterenol (Panel C). On the contrary, at a very low pacing frequency (0.05 Hz)  $I_{Ks}$  density did not increase during the application of the train (Panel B) leading to a steady-state  $I_{Ks}$  density markedly smaller than that obtained at 1 Hz (Panel C). These results add further support to the idea that  $I_{Ks}$  accumulated during brief atrial APs will contribute to AP repolarization, despite its very slow kinetics of activation.



Supplemental Figure 10



## References

1. Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Amorós I, Barana A, de Prada T *et al.* Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current I<sub>to1</sub>. *Cardiovasc Res.* 2008;**80**:375-384.
2. Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA *et al.* Nitric oxide increases cardiac I<sub>K1</sub> by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res.* 2009;**105**:383-392.
3. Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P *et al.* In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol.* 2010;**55**:2346-2354.
4. Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD *et al.* Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008;**1**:209-218.
5. Amorós I, Jiménez-Jáimez J, Tercedor L, Barana A, Gómez R, de la Fuente MG *et al.* Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm.* 2011;**8**:463-470.
6. Amorós I, Barana A, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP *et al.* Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;**48**:201-210.
7. Barana A, Amorós I, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP *et al.* Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc Res.* 2010;**85**:56-67.

8. Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M *et al.* Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;**107**:15631-15636.
9. Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward  $K^+$  current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res*. 1997;**80**:772-781.
10. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 1999;**44**:121-131.
11. Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier  $K^+$  current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res*. 1995;**76**:223-235.
12. Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res*. 1999;**42**:477-489.
13. Sampson KJ, Terrenoire C, Cervantes DO, Kaba RA, Peters NS, Kass RS. Adrenergic regulation of a key cardiac potassium channel can contribute to atrial fibrillation: evidence from an I Ks transgenic mouse. *J Physiol*. 2008;**586**:627-637.
14. Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hála O, Doerfel C *et al.* Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying  $K^+$  current ( $I_{K,Ach}$ ) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced  $I_{K,Ach}$  and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation*. 2001;**104**:2551-2557.

15. Terrenoire C, Clancy CE, Cormier JW, Sampson KJ, Kass RS. Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circ Res.* 2005;**96**:e25-e34.
16. Swartz MF, Fink GW, Lutz CJ, Taffet SM, Berenfeld O, Vikstrom KL *et al.* Left versus right atrial difference in dominant frequency,  $K^+$  channel transcripts, and fibrosis in patients developing atrial fibrillation after cardiac surgery. *Heart Rhythm.* 2009;**6**:1415-1422.
17. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type  $Ca^{2+}$  currents and human atrial fibrillation. *Circ Res.* 1999;**85**:428-436.
18. Christ T, Boknik P, Wöhrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF *et al.* L-type  $Ca^{2+}$  current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation.* 2004;**110**:2651-2657.

**Supplemental Table 1.** Characteristics of the patients whose samples were used for electrophysiological experiments.

	SR	CAF
Patients ( <i>n</i> )	36	32
Mean age (years)	68±2	67±2
Male/Female ( <i>n</i> )	24 (66.6%) / 12 (33.4%)	16 (50%) / 16 (50%)
Surgery		
Valve surgery ( <i>n</i> )	12 (33.3%)	20 (62.5%)
CABG surgery ( <i>n</i> )	8 (22.2%)	3 (9.4%)
Combined ( <i>n</i> )	16 (44.5%)	9 (28.1%)
Cardiopathy		
Valvular ( <i>n</i> )	12 (33.3%)	20 (62.5%)
Ischemic ( <i>n</i> )	8 (22.2%)	3 (9.4%)
Combined ( <i>n</i> )	16 (44.5%)	9 (28.1%)
Hypertension ( <i>n</i> )	28 (77.8%)	21 (65.6%)
Diabetes mellitus ( <i>n</i> )	10 (27.8%)	6 (18.7%)
Dyslipidemia ( <i>n</i> )	17 (47.2%)	16 (50%)
Left atrial diameter (cm)	4.2±0.2	5.0±0.2*
Ejection fraction (%)	48.6±2.2	49.2±2.4
NYHA functional class		
I ( <i>n</i> )	6 (16.6%)	4 (12.5%)
II ( <i>n</i> )	10 (27.8%)	11 (34.4%)
III ( <i>n</i> )	14 (38.9%)	16 (50%)
IV ( <i>n</i> )	6 (16.7%)	1 (3.1%)
Creatinine (mg/dL)	0.93±0.04	1.2±0.1
Pulmonar systolic pressure (mm Hg)	48.6±5.4	44.9±3.9
Treatment		
Beta blockers ( <i>n</i> )	19 (52.8%)	20 (62.5%)
ACE inhibitors/ARBs ( <i>n</i> )	28 (77.8%)	20 (62.5%)
Statins ( <i>n</i> )	21 (58.3%)	16 (50%)
Acetylsalicylic acid ( <i>n</i> )	23 (63.9%)	11 (34.4%)
Digoxin ( <i>n</i> )	1 (2.8%)	12 (37.5%)
Calcium antagonists ( <i>n</i> )	7 (19.4%)	4 (12.51%)
Diuretics ( <i>n</i> )	12 (33.3%)	21 (65.6%)
Spironolactone ( <i>n</i> )	4 (11.1%)	3 (9.4%)
Oral anticoagulants ( <i>n</i> )	1 (2.8%)	28 (87.5%)
Class I Antiarrhythmic drugs ( <i>n</i> )	0 (0%)	2 (6.2%)
Class III Antiarrhythmic drugs ( <i>n</i> )	0 (0%)	5 (15.6%)

ACE, angiotensin converting enzyme; ARBs, angiotensin II type 1 receptor blockers; CABG, coronary artery bypass grafting. \* P<0.05 vs SR patients.

**Supplemental Table 2.** Characteristics of the patients whose samples were used for mRNA expression analysis.

	SR	CAF
Patients qPCR ( <i>n</i> )	5	5
Mean age (years)	69±5	68±2
Male/Female ( <i>n</i> )	3 (60%) / 2 (40%)	3 (60%) / 2 (40%)
Surgery		
Valve surgery ( <i>n</i> )	3 (60%)	3 (60%)
CABG surgery ( <i>n</i> )	1 (20%)	1 (20%)
Combined ( <i>n</i> )	1 (20%)	1 (20%)
Cardiopathy		
Valvular ( <i>n</i> )	3 (60%)	3 (60%)
Ischemic ( <i>n</i> )	1 (20%)	1 (20%)
Combined ( <i>n</i> )	1 (20%)	1 (20%)
Hypertension ( <i>n</i> )	1 (20%)	1 (20%)
Diabetes mellitus ( <i>n</i> )	0 (0%)	2 (40%)
Dyslipidemia ( <i>n</i> )	2 (40%)	2 (40%)
Left atrial diameter (cm)	4.0±0.3	4.7±0.9
Ejection fraction (%)	56.0±3.6	45.0±6.6
NYHA functional class		
I ( <i>n</i> )	0 (0%)	1 (20%)
II ( <i>n</i> )	3 (60%)	2 (40%)
III ( <i>n</i> )	2 (40%)	2 (40%)
IV ( <i>n</i> )	0 (0%)	0 (0%)
Creatinine (mg/dL)	0.97±0.05	0.82±0.05
Pulmonar systolic pressure (mm Hg)	37.3±9.3	56.7±13.4
Treatment		
Beta blockers ( <i>n</i> )	4 (80%)	3 (60%)
ACE inhibitors/ARBs ( <i>n</i> )	3 (60%)	1 (20%)
Statins ( <i>n</i> )	2 (40%)	3 (60%)
Acetylsalicylic acid ( <i>n</i> )	2 (40%)	2 (40%)
Digoxin ( <i>n</i> )	1 (20%)	2 (40%)
Calcium antagonists ( <i>n</i> )	0 (0%)	1 (20%)
Diuretics ( <i>n</i> )	2 (40%)	3 (60%)
Spironolactone ( <i>n</i> )	0 (0%)	1 (20%)
Oral anticoagulants ( <i>n</i> )	1 (20%)	3 (60%)
Class I Antiarrhythmic drugs ( <i>n</i> )	0 (0%)	0 (0%)
Class III Antiarrhythmic drugs ( <i>n</i> )	0 (0%)	0 (0%)

ACE, angiotensin converting enzyme; ARBs, angiotensin II type 1 receptor blockers;

CABG, coronary artery bypass grafting.

**Supplemental Table 3.** Effects of isoproterenol on the time course and voltage dependence of I<sub>to1</sub> inactivation.

		Time course of I <sub>to1</sub> inactivation				Voltage dependence of I <sub>to1</sub> inactivation			
		Control		Iso 1 nM		Control		Iso 1 nM	
		$\tau_f$ (ms)	$\tau_s$ (ms)	$\tau_f$ (ms)	$\tau_s$ (ms)	V <sub>h</sub> (mV)	<i>k</i>	V <sub>h</sub> (mV)	<i>k</i>
SR	LAA	22.3±3.9	137.6±31.1	27.4±4.2	173.9±30.3	-41.7±1.1	6.7±0.5	-39.9±1.9	9.1±0.9
	RAA	20.4±2.2	103.5±11.9	24.0±3.6	183.3±37.6	-38.1±2.9	8.8±0.7	-40.8±3.1	11.0±1.5
CAF	LAA	29.1±3.6	135.1±30.7	31.0±1.8	153.7±31.9	-30.7±1.6	7.9±0.7	-31.2±2.3	8.7±0.7
	RAA	26.7±4.2	103.1±19.6	25.3±5.6	91.6±12.7	-37.7±5.1	8.9±0.3	-36.1±4.8	8.9±1.1

CAF= chronic atrial fibrillation; LAA= left atrial appendages; RAA= right atrial appendages; SR= sinus rhythm;  $\tau_f$  and  $\tau_s$  = fast and slow time constants, respectively, of current inactivation (measured at +50 mV); V<sub>h</sub> and *k*= midpoint and slope, respectively, of the inactivation curve. Statistical comparisons between SR and CAF or between LAA and RAA myocytes were performed by using ANOVA followed by Newman Keuls test. Statistical comparisons between control and isoproterenol data were performed by using Student's *t* tests. None of the differences reached statistical significance.

**Supplemental Table 4.** Effects of isoproterenol on I<sub>Ks</sub> activation and deactivation kinetics and on the voltage dependence of I<sub>Ks</sub> activation.

		Time course of I <sub>Ks</sub> activation/deactivation				Voltage dependence of I <sub>Ks</sub> activation			
		Control		Iso 1 nM		Control		Iso 1 nM	
		$\tau_{act}$ (ms)	$\tau_{deact}$ (ms)	$\tau_{act}$ (ms)	$\tau_{deact}$ (ms)	V <sub>h</sub> (mV)	<i>k</i>	V <sub>h</sub> (mV)	<i>k</i>
SR	LAA	2543±185	-	2171±196*	-	-	-	-	-
	RAA	2200±103	-	1961±185*	-	-	-	-	-
CAF	LAA	1499±194 <sup>†</sup>	623±126	980±105*	783±119	14.8±2.2	9.4±0.9	9.3±1.7*	11.7±1.5
	RAA	1670±244 <sup>†</sup>	592±94	1118±130*	709±101	17.5±3.3	12.1±1.9	9.1±3.6*	16.5±2.4

CAF= chronic atrial fibrillation; LAA= left atrial appendages; RAA= right atrial appendages; SR= sinus rhythm;  $\tau_{act}$  and  $\tau_{deact}$  = time constant of activation (measured at +60 mV) and deactivation (measured on tail currents at -40 mV after pulses to +60 mV), respectively; V<sub>h</sub> and *k*= midpoint and slope of the activation curve. In SR myocytes, tail currents were too small to allow a reliable measurement of kinetics and to construct activation curves. \* P<0.05 vs control. <sup>†</sup> P<0.05 vs SR.

**Supplemental Table 5.** Multiple linear-regression analysis of the effects of 1 nM isoproterenol.

	Coefficient	t	P
I <sub>to1</sub> inhibition. R <sup>2</sup> =0.774			
Female sex	3.6±9.7	0.4	0.71
Age, y	-0.34±0.3	-1.2	0.25
CAF	22.1±7.0	3.2	<b>0.005</b>
Ejection fraction (%)	0.3±0.3	0.9	0.40
III and IV functional class	-1.1±5.4	-0.2	0.80
Beta-blockers	-0.8±9.7	-0.1	0.93
ACE inhibitors / ARBs	0.6±8.8	0.1	0.94
I <sub>Ks</sub> increase. R <sup>2</sup> =0.306.			
Female sex	13.6±17.4	0.8	0.44
Age, y	0.3±0.9	0.4	0.70
CAF	49.4±20.8	2.4	<b>0.02</b>
Ejection fraction (%)	1.2±1.4	0.8	0.41
III and IV functional class	18.2±34.5	0.5	0.60
Beta-blockers	9.8±19.0	0.5	0.61
ACE inhibitors / ARBs	-10.0±23.0	-0.4	0.66
I <sub>K1</sub> inhibition. R <sup>2</sup> =0.394.			
Female sex	7.0±9.7	0.3	0.72
Age, y	-0.2±0.4	-0.6	0.57
CAF	29.7±13.3	2.2	<b>0.03</b>
Ejection fraction (%)	-0.9±0.7	-1.2	0.22
III and IV functional class	-14.1±13.2	-1.1	0.30
Beta-blockers	12.6±20.3	0.6	0.54
ACE inhibitors / ARBs	-16.5±13.1	-1.2	0.22

CAF: chronic atrial fibrillation; ACE: angiotensin II converting enzyme; ARBs: angiotensin II type 1 receptor blockers.





## **IV. DISCUSIÓN**



## 1. Heterogeneidad eléctrica de los miocitos auriculares en condiciones fisiológicas

Para comprender el remodelado de las corrientes iónicas inducido por la FA, primero es necesario conocer en profundidad las características eléctricas de los miocitos auriculares en condiciones fisiológicas. Es un hecho aceptado que los miocitos auriculares pueden generar PAs con distintas morfologías. Clásicamente, al menos dos tipos de PA han sido registrados en preparaciones de AD humana: uno con un pico prominente de repolarización rápida, seguido por una meseta y otro sin pico, con una fase de meseta de mayor duración (Trautwein y cols., 1962; Gelband y cols., 1972). Más adelante, se identificaron 3 tipos de PAs en miocitos de AD humana (Wang y cols., 1993), asociados a las distintas corrientes repolarizantes de salida de  $K^+$  que presentaban estas células. Sin embargo, a pesar de que estos hallazgos parecen indicar que no todas las células auriculares presentan las mismas corrientes repolarizantes, en los estudios en los que se analizaba el remodelado eléctrico producido por la FA, todos los miocitos de la AD se consideraban eléctricamente idénticos.

En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado que los miocitos auriculares de pacientes en RS son eléctricamente heterogéneos. Se pueden diferenciar tres tipos de miocitos auriculares en función de la principal corriente de  $K^+$  generada a potenciales de meseta:  $I_{to1}$ -predominante,  $I_{sus}$ -predominante e intermedio. La mayoría de las células mostraba un patrón intermedio con presencia simultánea de  $I_{to1}$  y de  $I_{sus}$ . Esta heterogeneidad eléctrica se acompañaba, además, de diferencias en el tamaño celular: las células  $I_{to1}$ -predominantes eran más pequeñas que las de patrón intermedio y éstas más pequeñas que las  $I_{sus}$ -predominantes. Es importante destacar que en RS, la distribución de los tres tipos celulares era prácticamente idéntica en ambas aurículas.

### 1.1. El componente sensible a dofetilida y 4-AP: la $I_{Kr}$ , la $I_{to1}$ y la $I_{Kur}$

El siguiente objetivo de la presente Tesis Doctoral fue identificar la composición de las corrientes de salida de  $K^+$  registradas en miocitos de la AD y la AI de pacientes en RS, para después poder compararlas con las registradas en miocitos con FA crónica. Para ello utilizamos una estrategia farmacológica, basada en inhibir secuencialmente las distintas corrientes de  $K^+$  responsables de la repolarización auricular.

La perfusión con dofetilida, un inhibidor específico de la  $I_{Kr}$  (Tamargo y cols., 2004b),

prácticamente no modificó la amplitud de la corriente registrada en situación control. Al medir por sustracción digital la amplitud del componente sensible a dofetilida o  $I_{Kr}$ , ésta resultó ser extremadamente pequeña, tanto en los miocitos de la AD como en los de la AI.

Después se perfundió con 4-AP (50  $\mu$ M), que a esa concentración inhibe selectivamente la corriente generada por canales Kv1.5 ( $I_{Kur}$ ) (Tamargo y cols., 2004b). La  $I_{Kur}$  representaba el 70% del total de la  $I_{sus}$ , confirmando su importante papel en la repolarización auricular humana.

Por último, se perfundieron las células con 4-AP (2 mM), concentración suficiente para inhibir a la  $I_{to1}$  (Tamargo y cols., 2004b). La morfología y las características de activación e inactivación del componente sensible a 4-AP (2 mM) se correspondían con las de la  $I_{to1}$  y su amplitud era similar en los miocitos de ambas aurículas.

A diferencia de la  $I_{to1}$ , tanto la amplitud, como la densidad de la  $I_{Kur}$  eran significativamente mayores en las células de la AD que en las de la AI. Es por esto que a pesar de que la distribución de las células con patrón  $I_{sus}$ -predominante e intermedio es igual en ambas aurículas, en condiciones fisiológicas existía un gradiente AD-AI de densidad de  $I_{Kur}$ .

Hasta la fecha, nunca se habían comparado las propiedades electrofisiológicas de ambas aurículas. Nuestros resultados demuestran que la AI y la AD de los pacientes en RS son eléctricamente distintas.

## 2. La FA crónica aumenta la heterogeneidad inter-auricular

Nuestros resultados demuestran que la FA crónica modifica la distribución de tipos celulares en ambas aurículas, disminuyendo el porcentaje de células de tipo  $I_{to1}$ -predominante. Observamos, además, que el porcentaje de disminución de las células con patrón  $I_{to1}$ -predominante era similar en la AI y en la AD, sin embargo, esta disminución se compensaba con un aumento del porcentaje de células con patrón intermedio en el caso de la AI, mientras que en la AD, el patrón celular que aumentaba, en compensación, era el  $I_{sus}$ -predominante. Además, todos los miocitos sufrían un aumento de tamaño, y las diferencias que se observaban en los miocitos de RS en cuanto al tamaño celular, desaparecían en la FA crónica, haciendo que el tamaño de los miocitos con patrón  $I_{to1}$ -predominante, que en RS eran más pequeños, fuera similar al de los  $I_{sus}$ -predominantes e intermedios.

## 2.1. Modificaciones producidas por la FA crónica sobre la $I_{Kr}$ , la $I_{to1}$ y la $I_{Kur}$

Las variaciones en el tamaño y la distribución de los tres patrones celulares inducidas por la FA crónica, se acompañaban, a su vez, de modificaciones en la amplitud y densidad de las corrientes repolarizantes de  $K^+$ . Para poder compararlas con los datos obtenidos en muestras de pacientes en RS, utilizamos la misma estrategia farmacológica en miocitos de la AD y la AI de pacientes con FA crónica.

En los miocitos de pacientes con FA crónica la amplitud de la  $I_{Kr}$ , medida como el componente sensible a dofetilida, era pequeña y de magnitud similar a la registrada en miocitos de RS, lo que confirma resultados previos que describían que la FA crónica no modifica la  $I_{Kr}$  (Bosch y cols., 1999).

Sin embargo, la FA crónica producía una disminución de la amplitud y densidad de la  $I_{to1}$  en ambas aurículas, siendo esta disminución mayor en la AI que en la AD. Como resultado, en los miocitos de pacientes con FA crónica, la densidad de la  $I_{to1}$  en la AD es mayor que en la AI. Por el contrario, aunque se observó una disminución de la amplitud y la densidad de la  $I_{Kur}$  en ambas aurículas, ésta disminución era más marcada en la AD que en la AI.

Por lo tanto, la FA crónica generaba un gradiente AD-AI en la densidad de la  $I_{to1}$  que no existía en los pacientes en RS, mientras que anulaba el gradiente fisiológico AD-AI de la  $I_{Kur}$ , lo que en conjunto, provocaba un aumento de la heterogeneidad interauricular.

Los resultados electrofisiológicos se pudieron explicar mediante el análisis de la expresión del ARNm de las proteínas que forman los canales responsables de estas corrientes.

En los miocitos de RS no existían diferencias entre las dos aurículas en los niveles del ARNm que codifican las proteínas Kv4.3 (subunidad  $\alpha$  de los canales que generan la  $I_{to1}$ ). Sin embargo, en la FA crónica se producía una disminución de este ARNm, que era más marcada en la AI que en la AD. Por tanto, a pesar de que no han sido confirmados midiendo el nivel de proteínas Kv4.3, estos datos sugieren que la disminución de la  $I_{to1}$  observada en la AD, se debe a una disminución del número de canales presentes en la membrana. Éste es un resultado consistente con los obtenidos en diversos estudios en pacientes con FA crónica (Michael y cols., 2009; Brundel y cols., 2001; Bosch y cols., 1999; Delpón y cols., 2005; Van Wagoner y cols., 1997; Workman y cols., 2001; Nattel y cols., 2010).

Por el contrario, los niveles del ARNm que codifica las proteínas Kv1.5 (subunidad  $\alpha$  de los canales que generan la  $I_{Kur}$ ) en RS eran iguales en ambas aurículas. Este resultado no coincidía con lo esperado, ya que el análisis electrofisiológico indicaba que en condiciones

fisiológicas, tanto la amplitud, como la densidad de la  $I_{Kur}$  eran mayores en la AD que en la AI. Lo más probable es que existan modificaciones post-traduccionales que determinen que la expresión de las subunidades Kv1.5 sea mayor en la AD que en la AI.

Por otra parte, la FA crónica no modificaba significativamente el nivel de ARNm de Kv1.5 en ninguna de las dos aurículas. Tampoco este resultado coincidía con lo que esperábamos, sin embargo, otros autores habían descrito previamente que los niveles de expresión del ARNm que codifica los canales Kv1.5 no disminuían en pacientes con FA. (Brundel y cols., 2001; Bosch y cols., 1999; Van Wagoner y cols., 1997; Christ y cols., 2008). En este caso, la disminución de la  $I_{Kur}$  podría atribuirse a procesos proteolíticos activados por la FA crónica que disminuyen la expresión de la proteína Kv1.5, sin modificar los niveles de ARNm.

Estos resultados demuestran que el remodelado eléctrico inducido por la FA crónica aumenta las diferencias eléctricas entre ambas aurículas. Esto podría favorecer la estabilidad de la arritmia, ya que una mayor heterogeneidad en la repolarización auricular hace que el tejido auricular no sea excitable de forma homogénea, provocando que el frente de ondas no pueda seguir una propagación lineal, lo que favorece la reentrada y la perpetuación de los rotores que mantienen la FA.

## 2.2. ¿Qué aurícula es la más afectada por la FA crónica?

Estudios clínicos y experimentales habían demostrado que, en particular durante los episodios de FA paroxística, la AI soporta mayores frecuencias de estimulación que la AD (Sarmast y cols., 2003; Sanders y cols., 2005). La teoría más extendida para explicar el fenómeno del remodelado eléctrico se basa en que las elevadas frecuencias de activación que soportan las aurículas durante la FA, producen una sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , modificación que induciría el resto de cambios que caracterizan el remodelado eléctrico.

Asumiendo que el remodelado eléctrico es consecuencia de la rápida frecuencia de activación auricular (Michael y cols., 2009), nuestra hipótesis inicial fue que si el remodelado debía afectar de forma más marcada a una aurícula que a otra, entonces la aurícula más afectada sería la AI.

Sin embargo, se ha descrito que en los pacientes con FA crónica se anula el gradiente de frecuencia dominante AI-AD, que sí existía en el caso de los pacientes con FA paroxística. De este modo, en los pacientes con FA crónica ambas aurículas soportan las mismas frecuencias

de activación (Lazar y cols., 2004; Voigt y cols., 2010), por lo que sería lógico pensar que tanto la AI como la AD sufran intensas modificaciones.

Los datos recogidos en la presente Tesis Doctoral sugieren que en los pacientes con FA crónica ambas aurículas sufren profundos cambios, pero que éstos son distintos en cada una de ellas. Este sorprendente resultado hace pensar que probablemente otros factores, y no sólo el aumento en la frecuencia de activación, provocan el remodelado eléctrico característico de la FA crónica.

Además, esta teoría se refuerza con los resultados de estudios sobre la eficacia de la técnica de ablación de focos en las dos aurículas en pacientes con FA crónica, que demuestran que se trata de una arritmia biauricular (Rostock y cols., 2008), en la que ambas aurículas están profundamente afectadas.

Sin embargo, los resultados de la presente Tesis Doctoral no explican por qué el remodelado producido por la FA crónica es distinto en la AI y en la AD. Para responder a esta cuestión es necesario realizar nuevos estudios en el futuro.

### 3. El componente resistente a 4-AP: la $I_{Ks}$

Un resultado novedoso y relevante de la presente Tesis Doctoral es que, en ambas aurículas, la FA crónica aumentaba extraordinariamente la amplitud y la densidad de corriente del componente resistente a 4-AP sensible a TEA. Los resultados demostraron que se trataba de una única corriente de salida tiempo-dependiente sensible a HMR-1556. Estas características, junto con el valor positivo del punto medio de la curva de activación ( $V_h \approx 8$  mV) y la lenta cinética de activación ( $\tau_{act} > 2$  s), sugerían, claramente, que esta corriente era la  $I_{Ks}$ .

La amplitud de la  $I_{Ks}$  era muy pequeña en los miocitos de ambas aurículas de pacientes en RS. Sin embargo, en los miocitos tanto de la AI, como de la AD de pacientes con FA crónica, la amplitud de la  $I_{Ks}$  aumentaba hasta 2.5 veces, en comparación con la corriente registrada en los miocitos de pacientes en RS.

El análisis de la expresión del ARNm que codifica las proteínas Kv7.1 y minK (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales que generan la  $I_{Ks}$ , respectivamente) demostró que en los pacientes con FA crónica se producía una disminución de Kv7.1 y un aumento de minK simultáneamente, siendo este efecto idéntico en ambas aurículas. Los resultados en cuanto a las alteraciones en la expresión de Kv7.1 y minK producidas por la FA crónica son



controvertidos, en la bibliografía podemos encontrar la descripción tanto de un aumento, como de una disminución del ARNm de ambas proteínas (Michael y cols., 2009; Brundel y cols., 2001; Lai y cols., 1999). Nuestros resultados coinciden con lo descrito por Lai y colaboradores (Lai y cols., 1999). Sorprende que, a diferencia de lo que ocurre en otras corrientes, en el caso de la  $I_{Ks}$  el aumento en la densidad de la corriente se debe a un aumento de la subunidad  $\beta$  de los canales que la generan, y no de la subunidad  $\alpha$ .

Se ha demostrado que aunque la expresión de minK *per se* no forma ningún canal funcional, la coexpresión de minK con Kv7.1 genera una corriente con una amplitud 10 veces mayor que la generada por la subunidad  $\alpha$  sola (Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 2003), con características muy similares a las de la  $I_{Ks}$  nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b; Charpentier y cols., 2010). Además, la presencia de minK modifica la sensibilidad al pH intracelular y a la temperatura (Unsold y cols., 2000;) y aumenta la conductancia de los canales Kv7.1 (Charpentier y cols., 2010). Actualmente se acepta que la  $I_{Ks}$  se genera a través de canales formados por 4 subunidades  $\alpha$  Kv7.1, ensambladas con, al menos, 2 subunidades auxiliares minK (Chen y cols., 2003a). La gran implicación de minK en la determinación de la amplitud de la  $I_{Ks}$  podría explicar que el aumento del ARNm de minK inducido por la FA fuera el responsable del aumento en la densidad de la  $I_{Ks}$  observado en los miocitos de estos pacientes.

Esta es la primera demostración de que la FA crónica provoca el aumento de una corriente de  $K^+$  voltaje-dependiente. Nuestra hipótesis es que el aumento de la  $I_{Ks}$  no es un epifenómeno que, simultáneamente con otros, sucede en el proceso de remodelado eléctrico asociado a la FA crónica. Por el contrario, consideramos que junto con la disminución de la  $I_{CaL}$  y el aumento de la  $I_{K1}$ , el aumento de la  $I_{Ks}$  constituye un cambio que contribuye de forma crítica al acortamiento de la DPA y del periodo refractario auricular.

Sin embargo, la contribución de la  $I_{Ks}$  a la repolarización cardíaca ha sido materia de debate durante mucho tiempo (Kurokawa y cols., 2001; Liu y cols., 2012). El principal problema se encuentra en que para activar la  $I_{Ks}$  en condiciones de *voltage clamp* es necesario utilizar pulsos despolarizantes de larga duración (2-5 s), mientras que el PA auricular humano tiene una duración en el rango de 150-250 ms. Esto ha llevado a proponer que el grado de activación de la  $I_{Ks}$  durante un PA auricular humano sería mínimo y, por tanto, su participación en la repolarización, despreciable.

En RS, la diástole es suficientemente larga para completar totalmente la deactivación de la  $I_{Ks}$  entre dos latidos. Sin embargo, a medida que la frecuencia cardíaca aumenta, tanto la DPA

como el intervalo interdiastólico se acortan, haciendo que la deactivación de los canales que generan la  $I_{Ks}$  no llegue a completarse al comenzar el siguiente PA (Faber y Rudy, 2000). Esto provoca que los canales que generan la  $I_{Ks}$  se acumulen en un estado no conductor, pero muy cercano al estado abierto durante la diástole, y que en la siguiente despolarización, pasen al estado abierto-conductor casi inmediatamente, generando una corriente de salida de  $K^+$  cada vez mayor (Roden y Yang, 2005). Es decir, la  $I_{Ks}$ , a diferencia del resto de las corrientes iónicas, aumenta al aumentar la frecuencia cardiaca.

Por tanto, la amplitud de la  $I_{Ks}$  generada al activar el miocardio a una frecuencia constante con PAs de duración breve es mucho mayor que la de la corriente generada por un único pulso rectangular de igual duración (Delpón y cols., 1995). Para confirmar esta hipótesis, ejecutamos un modelo matemático de  $I_{Ks}$  desarrollado por el grupo de Terrenoire (Terrenoire y cols., 2005), que nos permitía comparar la densidad de la  $I_{Ks}$  en estado estacionario al aplicar un tren de pulsos de 150 ms a bajas (0.05 Hz) y altas (1 Hz) frecuencias, tanto en RS como en FA crónica, con la generada por un único pulso de la misma duración. A frecuencias de estimulación bajas, la  $I_{Ks}$  no se acumulaba durante la aplicación del tren de pulsos, de forma que la densidad de la  $I_{Ks}$  en estado estacionario a 0.05 Hz, era marcadamente menor que la generada cuando se estimulaba a 1 Hz. Sin embargo, la  $I_{Ks}$  generada en estado estacionario tras estimular la célula a 1 Hz era un 60% mayor que la generada por un único pulso.

Por tanto, los resultados del modelo matemático confirmaron la hipótesis de que la  $I_{Ks}$  acumulada durante la estimulación continua contribuye a la repolarización auricular, a pesar de su lenta cinética de activación. Por lo tanto, el aumento en la  $I_{Ks}$  podría contribuir de forma crítica al acortamiento de la DPA producido por la FA crónica, caracterizada por unas frecuencias de activación >5 Hz.

Durante la FA, la conducción del frente de ondas se caracteriza por un patrón de propagación complejo denominado conducción fibrilatoria, en el que se produce reentrada, fragmentación de los frentes de ondas y formación de rotores. Un frente de ondas se rompe cuando éste no es capaz de excitar al tejido que tiene por delante, bien porque exista un obstáculo anatómico inexcitable, o bien porque el tejido excitable se encuentre en periodo refractario. Cuando esto ocurre, el frente de ondas se curva y se forma un rotor (Jalife, 2011). La  $I_{Ks}$ , debido a su lenta deactivación, tiene un papel destacado en el control de la excitabilidad del tejido durante el intervalo diastólico (es decir, en el control de la refractariedad post-repolarización), ya que a medida que aumenta la frecuencia, el

consiguiente aumento de la  $I_{Ks}$  acorta la DPA y el periodo refractario, permitiendo que las células auriculares sean capaces de soportar frecuencias elevadas. Se ha demostrado que un aumento en la  $I_{Ks}$  reduce el área del sustrato necesario para inducir y mantener la reentrada, es decir, aumenta la susceptibilidad del tejido a la arritmogénesis (Kharche y cols., 2012) y estabiliza los rotores que mantienen la excitación reentrante en un área limitado de tejido auricular (Muñoz y cols., 2007; Kharche y cols., 2012). Esto podría explicar la aparición de conducción fibrilatoria en aquéllas condiciones en las que la  $I_{Ks}$  está aumentada, como en la FA crónica, donde podría estar jugando un importante papel en la perpetuación de la misma.

Es razonable especular que una inhibición frecuencia-dependiente de la  $I_{Ks}$ , como la producida por propafenona (Delpón y cols., 1995), podría ser útil en el contexto de la protección frente a taquiarritimias generadas por mecanismos de reentrada como la FA crónica, convirtiendo así a la  $I_{Ks}$  en una posible diana para la terapia antiarrítmica (Stengl y cols., 2003; Muñoz y cols., 2007; Islam, 2010).

### 3.1. Mutaciones en los genes de las subunidades que generan la $I_{Ks}$ asociadas a FA familiar

Es un hecho demostrado que mutaciones en los genes que codifican tanto a la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (KCNQ1), como a la principal subunidad  $\beta$  minK (KCNE1) responsables de la  $I_{Ks}$ , dan lugar a la aparición de diversos síndromes arritmogénicos. Este hecho apoya de forma irrefutable el importante papel y la implicación de la  $I_{Ks}$  en la repolarización cardíaca humana.

A nivel ventricular, mutaciones con pérdida de función (es decir, que disminuyen la densidad de la  $I_{Ks}$ ) en los genes KCNQ1 y KCNE1 se asocian con una prolongación de la repolarización y con SQTl tipo 1 y 5 respectivamente (Kurokawa y cols., 2001; Cerrone y Priori, 2011; Wilde y Brugada, 2011; Cerrone y cols., 2012). Por el contrario, mutaciones de ganancia de función de KCNQ1 y KCNE1 acortan la DPA, tanto en los ventrículos como en las aurículas, lo que se manifiesta como SQTC tipo 2 y FA familiar tipo 1 (Bellocq, 2004; Hong y cols., 2005).

El estudio genético de familias con FA ha permitido asociar varias mutaciones con la arritmia. En 2003 se describió la primera mutación asociada con FA familiar en el gen KCNQ1 (S140G), que provocaba un fenotipo de ganancia de función del canal. Paradójicamente, parte de los familiares afectados mostraba, a nivel ventricular, una prolongación del intervalo QT (Chen y cols., 2003).

A partir de entonces, más casos de FA familiar han sido atribuidos a mutaciones con ganancia de función en el gen KCNQ1 (Bellocq y cols., 2004; Hong y cols., 2005; Lundby y cols., 2007; Zhang y cols., 2008; Das y cols., 2009; Abraham y cols., 2010; Henrion 2012), algunas asociadas con SQTc, (sugiriendo que la mutación también aumentaba la  $I_{Ks}$  ventricular) (Hong y cols., 2005), otras con SQTl (Lundby y cols. 2007) y otras que no modificaban significativamente el intervalo QT (Das y cols., 2009). Algunas de estas mutaciones en KCNQ1 sólo exhiben su fenotipo de ganancia de función en presencia de la subunidad KCNE1 (Hong y cols., 2005; Restier, 2008; Chan y cols, 2012).

En general, sin tener en cuenta los efectos sobre la repolarización ventricular, las mutaciones con ganancia de función en KCNQ1 y/o KCNE1, aumentan la  $I_{Ks}$  y producen FA debido, probablemente, al acortamiento de la DPA que provocan (Seeböhm, 2009).

Por otra parte, también se han descrito mutaciones que producen una disminución de la  $I_{Ks}$  asociadas con formas familiares de FA, tanto en KCNQ1 (Bartos y cols., 2001; Girmatsion y cols., 2011) como en KCNE1 (Ehrlich y cols., 2005).

Mediante modelos matemáticos se ha sugerido que estas mutaciones con pérdida de función producen una prolongación de la DPA auricular. Esta paradójica asociación entre una prolongación de la DPA y la presencia de FA, puede explicarse porque, en determinadas condiciones (reserva de la repolarización reducida) la prolongación del PA facilita la generación de postpotenciales precoces, que a su vez, generan PAs a altas frecuencias que desencadenan la FA. (Ehrlich y cols., 2005).

En general, tanto la pérdida, como la ganancia de función de los canales que generan la  $I_{Ks}$ , se relaciona con la aparición de FA, por distintos mecanismos, apoyando la idea de que esta corriente tiene un importante papel en la repolarización auricular, y en la determinación de la DPA.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral demuestran que el remodelado eléctrico inducido por la presencia de FA crónica produce un efecto de “ganancia de función” en los canales que generan la  $I_{Ks}$ , que, de forma similar a las variantes genéticas de FA descritas, provoca un acortamiento de la DPA que favorece la estabilización de la arritmia.

#### 4. Remodelado inducido por la FA crónica sobre la $I_{CaL}$ y la $I_{K1}$

Hasta la fecha, las dos modificaciones provocadas por la FA crónica que parecían contribuir de forma más crítica al acortamiento de la DPA y del periodo refractario auricular eran, por un lado, la disminución de la expresión de los canales que generan la corriente despolarizante  $I_{CaL}$  (Van Wagoner y cols., 1999) y por otro, el aumento en la expresión de los canales que generan la  $I_{K1}$ , corriente con rectificación interna independiente de voltaje (Michael y cols., 2009; Bosch y cols., 1999; Dobrev y cols., 2005). Por este motivo, también comparamos la amplitud y densidad de estas corrientes en miocitos de pacientes en RS y con FA crónica.

La  $I_{K1}$  se registró en presencia de glibenclamida (inhibidor selectivo de la  $I_{KATP}$ ) y de atropina (inhibidor de la  $I_{K,ACh}$ ) para evitar la contaminación con otras corrientes con rectificación interna. Además, esta corriente se inhibía totalmente en presencia de  $BaCl_2$ , sugiriendo que la corriente registrada era la  $I_{K1}$ . Nuestros resultados confirmaron que la densidad de la  $I_{K1}$  era significativamente mayor en los miocitos de pacientes con FA crónica que en los de RS. Este aumento se ha atribuido a un aumento en los niveles del ARNm que codifica las proteínas Kir2.1 en pacientes con FA crónica (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Dobrev y cols., 2001 y 2002; Gaborit y cols., 2005 y 2007; Nattel y cols., 2010).

El aumento de la  $I_{K1}$  contribuye tanto al acortamiento de la DPA, como a la aceleración de los rotores que mantienen la FA, ya que hiperpolariza las células, eliminando la inactivación voltaje-dependiente de la  $I_{Na}$ . (Dhammon y Jalife, 2005; Wakili y cols., 2011).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral confirman que la FA crónica produce una marcada disminución de la densidad de la  $I_{CaL}$  (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999; Skasa y cols., 2001; Schotten y cols., 2011). Se ha descrito que el remodelado eléctrico produce una disminución en la expresión del ARNm y de los niveles de Cav1.2, la subunidad  $\alpha$  del canal de  $Ca^{2+}$  tipo L (Brundel y cols., 2001; Gaborit y cols., 2005; Schotten y cols., 2011). La disminución de la  $I_{CaL}$  es un mecanismo compensatorio que trata de reducir la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  que produce la elevada frecuencia cardiaca propia de la FA, y ocurre de forma inmediata.

Ambas modificaciones se han considerado las principales responsables del acortamiento de la DPA y del periodo refractario, mientras que las disminuciones en las densidades de la  $I_{to1}$  y de la  $I_{Kur}$ , se consideran epifenómenos derivados de éstas.

Sin embargo, los resultados de la presente Tesis Doctoral en relación al enorme aumento de la  $I_{Ks}$  provocado por la FA crónica, hacen pensar que quizás esta corriente también esté implicada en el acortamiento de la DPA y del periodo refractario al mismo nivel al que lo están las modificaciones de la  $I_{CaL}$  y de la  $I_{K1}$ .

## 5. Remodelado de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos inducido por la FA crónica

El siguiente objetivo de la presente Tesis Doctoral fue describir los mecanismos responsables de los efectos electrofisiológicos producidos por la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en FA crónica, ya que varios datos clínicos y experimentales apuntaban a que la estimulación adrenérgica podría estar relacionada con el inicio y/o el mantenimiento de la FA.

Con el objetivo de estudiar las modificaciones que la FA crónica pudiera producir en los principales efectores de la respuesta  $\beta_1$ -adrenérgica en el tejido auricular humano, realizamos un análisis cuantitativo de los niveles de expresión del ARNm del receptor  $\beta_1$ -adrenérgico, de las AC V y VI y de las PDE 3A y 4A, que regulan de forma crítica la intensidad de la respuesta  $\beta_1$ -adrenérgica en el miocardio auricular humano (Omori y Kotera, 2007; Zaccolo y Movsesian, 2007; Xiang, 2011).

Nuestros resultados demostraron que la FA crónica producía un aumento de  $\approx 30\%$  en el nivel de ARNm del receptor  $\beta_1$ -adrenérgico. Además, el aumento del ARNm resultó ser un 40% mayor en la AI que en la AD. Por el contrario, los niveles de ARNm de las AC V y VI y las PDE 3A y 4A permanecían inalterados con respecto a los niveles obtenidos en las muestras de RS y no existían diferencias entre ambas aurículas, sugiriendo que si los efectos de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos eran distintos en RS y en FA crónica, sería debido al remodelado de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, y no al de otros efectores de la vía de señalización.

Publicaciones anteriores demuestran que la FA crónica está asociada con aumentos en la expresión de distintos receptores como el de serotonina 5-HT<sub>4(b)</sub> (Lezoualc'h y cols., 2007), el de angiotensina II tipo 1 (exclusivamente en la AI) (Boldt y cols., 2003; Cong y cols., 2010) y el de mineralocorticoides (Tsai y cols., 2010). Por el contrario, también se ha descrito que la FA crónica provoca una disminución en la expresión de receptores como el receptor opioide kappa (Lendeckel y cols., 2005) o los receptores muscarínicos M2, M3 y M4 (Yeh y cols., 2007). Esto hace pensar que las modificaciones en la expresión de receptores también forman parte del complejo remodelado de las aurículas inducido por la FA crónica.

Sin embargo, hasta la fecha nunca se había estudiado el remodelado de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, a pesar de que las alteraciones del tono nervioso, especialmente las del sistema nervioso simpático, están relacionadas con el inicio de los paroxismos de FA (Workman, 2010; Bettoni y Zimmermann; 2002). De hecho, en un estudio en pacientes con FA paroxística, la infusión de ISO (un agonista  $\beta_1$ -adrenérgico) provocó el inicio de un episodio de FA en el 84% de los pacientes (Oral y cols., 2008). Además, se ha demostrado que la FA post-quirúrgica tiene un origen simpático, un hecho que podría explicar la relativa eficacia de la administración de fármacos  $\beta$ -bloqueantes en la prevención de esta forma de FA (Workman, 2010; Ali y cols., 1997). Por otro lado, el bloqueo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos se ha asociado con una disminución de la incidencia de FA en sujetos sanos, en pacientes con disfunción del VI tras infarto de miocardio y en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (Psaty y cols., 1997; McMurray y cols., 2005; van Veldhuisen y cols., 2006).

Patologías cardiovasculares de elevada prevalencia como la insuficiencia cardíaca o la hipertensión llevan asociado un aumento del tono simpático. En el caso de la insuficiencia cardíaca, se produce una activación del tono simpático que inicialmente pretende preservar la homeostasis cardiovascular y compensar la función cardíaca insuficiente, sin embargo, a largo plazo, la hiperactividad simpática tiene efectos deletéreos sobre la estructura y funcionalidad cardíacas. Se produce un aumento de la noradrenalina circulante, una disminución de la noradrenalina en los cardiomiocitos y una disminución de los niveles de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos cardíacos. La elevación de los niveles plasmáticos de catecolaminas tiene efectos cardiotóxicos que empeoran la función cardíaca. El tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes (bisoprolol, carvedilol y metoprolol) ha demostrado reducir la morbi-mortalidad en estos pacientes (Triposkiadis y cols., 2009).

En la hipertensión, la activación excesiva del tono simpático afecta al riñón, provocando una retención inapropiada de  $\text{Na}^+$ , estimulación de la liberación de renina y una función renal disminuida (Di Bona, 2002; Goldsmith y cols., 2010).

Curiosamente, tanto la insuficiencia cardíaca como la hipertensión arterial, aumentan marcadamente el riesgo de desarrollar FA. Por tanto, se podría afirmar que la marcada activación del sistema nervioso simpático podría estar contribuyendo al desarrollo de la FA. Nuestros resultados hacen pensar que el remodelado del sistema adrenérgico podría ser parte del sustrato de la FA y si esto fuera así, la administración de  $\beta$ -bloqueantes podría ser útil en el contexto de la prevención de la recurrencia de la FA.

### 5.1. Efecto de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos sobre las corrientes de $K^+$ repolarizantes voltaje-dependientes y sobre la $I_{K1}$ en RS y en FA crónica

Nuestros resultados demostraron, por primera vez, que en miocitos de pacientes en RS, la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos inhibía la  $I_{to1}$  de forma concentración-dependiente. Además, la inhibición producida era tiempo y voltaje-independiente, ya que no se modificaban ni el punto medio de la curva de inactivación, ni la constante de tiempo de la inactivación. Además, la inhibición de la  $I_{to1}$  mediada por ISO se prevenía totalmente en presencia de atenolol (antagonista selectivo de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos a esa concentración), lo que demostraba que el efecto del ISO estaba mediado exclusivamente por la activación de receptores  $\beta_1$  y no de otro subtipo.

Marshall y colaboradores han publicado recientemente que la  $I_{to1}$  se mantenía inalterada en presencia de ISO en miocitos de pacientes en RS (Marshall y cols., 2012). No conocemos las razones de esta discrepancia; sin embargo, y a parte de la diferencia en las concentraciones de ISO utilizadas (utilizaban concentraciones 1000 veces mayores), mantenemos la hipótesis de que podría deberse a los efectos que el tratamiento enzimático utilizado por estos autores para la disociación de miocitos pudiera tener sobre la expresión de las proteínas de membrana.

Nuestros resultados son la primera demostración de que la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos produce una disminución de la  $I_{to1}$  significativamente mayor en los miocitos de pacientes con FA crónica que en los de pacientes en RS. Además, la inhibición es mayor en los miocitos de la AI.

Quisimos determinar si la inhibición de la  $I_{to1}$  mediada por la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos era debida a la activación de la ruta canónica de la AC-PKA. Esta vía es la responsable de los efectos producidos por los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre los restantes canales cardíacos (Workman, 2010; Tamargo y cols., 2004b; Walsh y Kass, 1988; Volders y cols., 2003). Nuestros resultados preliminares confirmaron esta hipótesis, ya que el efecto del ISO se abolía en presencia tanto de ciclopentiladenina (un inhibidor selectivo de la AC) como del inhibidor de la PKA (PKI).

Por otro lado, confirmamos resultados previos que demostraban que la  $I_{Kur}$  es muy poco sensible a la estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica (Li y cols., 1996b), ya que el ISO no producía ningún efecto significativo a concentraciones menores de 10 nM, y este resultado se reproducía en los miocitos, tanto de la AD como de la AI, y tanto en los de RS, como en los de FA crónica.



Los efectos de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la  $I_{K1}$  auricular humana tampoco se habían estudiado previamente. Los resultados de la presente Tesis Doctoral demostraron que la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos inhibía el componente de entrada de la  $I_{K1}$  generado a potenciales más negativos del  $E_K$ , sin embargo, no producía efectos significativos sobre el componente de salida generado a potenciales más positivos del  $E_K$ . Este hecho limita la posible relevancia del hallazgo, ya que en condiciones fisiológicas el PR auricular es más despolarizado que el  $E_K$ . Tal y como ocurría con la  $I_{to1}$ , la inhibición de la  $I_{K1}$  producida por la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos era más marcada en los miocitos de FA crónica que en los de RS, y en los de la AI que en los de la AD.

## 5.2. Efecto de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la $I_{Ks}$ en RS y en FA crónica

En la presente Tesis Doctoral se ha confirmado que la  $I_{Ks}$  es extremadamente sensible a la estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica. El ISO producía un importante aumento en la amplitud y la densidad de la  $I_{Ks}$  a potenciales  $\geq +20$  mV y  $\geq -20$  mV en RS y en FA crónica, respectivamente.

Además, el aumento de la  $I_{Ks}$  producido por la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos era significativamente mayor en los miocitos de pacientes con FA crónica que en los de pacientes en RS, y en los miocitos de la AI, que en los de la AD, como se pudo comprobar al comparar los valores de  $EC_{50}$  de las curvas dosis-respuesta. De forma análoga a lo que ocurría con la  $I_{to1}$ , el efecto del ISO se prevenía totalmente en presencia de atenolol. Por otra parte, el efecto del ISO sobre la  $I_{Ks}$  en miocitos de FA crónica era tiempo- y voltaje-dependiente, ya que estaba acompañado por un desplazamiento hacia la izquierda del punto medio de la curva de activación y por una aceleración de la cinética de activación. Por el contrario, las constantes de deactivación no se modificaban en presencia de ISO.

Nuestros resultados concuerdan con los de diversos estudios en modelos animales, que ya habían demostrado que la contribución de la  $I_{Ks}$  a la repolarización adquiere un papel crítico en presencia de estimulación  $\beta$ -adrenérgica (Walsh y Kass, 1988; Volders y cols., 2003; Stengl y cols., 2003). En estos estudios, y coincidiendo con nuestros resultados experimentales, la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos aumentaba la conductancia de la  $I_{Ks}$  y desplazaba la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales más negativos (Walsh y Kass, 1988; Sanguinetti y cols. 1991; Han y cols. 2001; Volders y cols. 2003).

Además, la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos producía cambios en la cinética de la  $I_{Ks}$ , como una aceleración de la activación (Han y cols. 2001; Volders y cols. 2003; Stengl y cols., 2003) y una deceleración de la deactivación (Stengl y cols., 2003). La aceleración de la activación se traduce en un aumento en el número de canales en estado abierto durante un único pulso, aumentando, a su vez, la densidad de la  $I_{Ks}$  en estado estacionario en los siguientes pulsos. Por otro lado, una deactivación más lenta tiene como resultado una mayor acumulación, ya que menos canales tienen tiempo de desactivarse en un determinado intervalo entre pulsos, y por tanto, quedan más canales en estado abierto en la siguiente despolarización (Stengl y cols., 2003).

Estudios en diversas preparaciones de tejido cardíaco de distintos modelos animales (células de Purkinje caninas, células del nodo SA de conejo, miocitos ventriculares caninos) (Han y cols., 2001; Lei y cols., 2002; Volders y cols., 2003) demostraron que a pesar de que la contribución de la  $I_{Ks}$  a la DPA en condiciones basales era mínima, esta corriente adquiría gran importancia en presencia de estimulación  $\beta$ -adrenérgica. De hecho, en un estudio en perros conscientes, en los cuales se asume que existe un cierto nivel de estimulación adrenérgica, la repolarización ventricular era claramente dependiente de la densidad de la  $I_{Ks}$  (Volders y cols., 2003).

Sin embargo, podría argumentarse que en nuestros resultados, el efecto del ISO aparece sólo cuando se utilizan pulsos de larga duración (4 s) para generar la  $I_{Ks}$ , mientras que estos efectos no se observaban en la corriente generada al final del pulso de 250 ms, siendo ésta una duración que se asemeja más a la del PA auricular humano. Esto podría suponer una duda en cuanto a la relevancia fisiológica de los resultados presentados, particularmente considerando que la  $DPA_{90}$  registrada en los miocitos de FA crónica era de  $\approx 100$  ms.

Para confirmar la hipótesis de que la densidad de la  $I_{Ks}$  y por tanto, su contribución a la fase de repolarización auricular, aumentan marcadamente a frecuencias de estimulación crecientes, especialmente tras la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos (Stengl y cols., 2003; Terrenoire y cols., 2005; Islam, 2010), ejecutamos de nuevo el modelo matemático de  $I_{Ks}$  desarrollado por el grupo de Terrenoire (Terrenoire y cols., 2005) para simular el efecto de la estimulación adrenérgica sobre la  $I_{Ks}$  (Terrenoire y cols., 2005; Sampson y cols., 2008). Los resultados al ejecutar el modelo demostraron que la  $I_{Ks}$  acumulada, y por tanto, la densidad de la  $I_{Ks}$  en estado estacionario, eran mayores en presencia de ISO que en su ausencia, coincidiendo con nuestros datos experimentales, pero este efecto sólo ocurría a la frecuencia más alta (1 Hz), mientras que a 0.05 Hz la densidad de la  $I_{Ks}$  en estado estacionario era

marcadamente menor, tanto en presencia como en ausencia de estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica.

### 5.3. Efecto de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la $I_{CaL}$

Nuestros resultados confirman que la  $I_{CaL}$  es muy sensible a la estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica. La estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos producía un aumento significativo de la  $I_{CaL}$ , siendo este efecto más marcado en los miocitos de pacientes con FA crónica que en los de pacientes en RS. El grupo de Van Wagoner obtuvo resultados similares al analizar el efecto del ISO 1  $\mu$ M en miocitos de pacientes en RS y con FA crónica (Van Wagoner y cols., 1999). Por el contrario, existe otro estudio en el que el ISO 1  $\mu$ M provocaba el mismo incremento de la  $I_{CaL}$  en miocitos de pacientes en RS que en los miocitos de pacientes con FA crónica (Christ y cols., 2004). No conocemos las razones de esta discrepancia, sin embargo, nuestros resultados apuntan a que la FA crónica provoca una potenciación de los efectos  $\beta_1$ -adrenérgicos en todas las corrientes auriculares estudiadas mediada por el aumento en el número de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos inducido por la FA, por lo que parece lógico pensar que el resultado más plausible es que ocurra lo mismo en la  $I_{CaL}$ .

## 6. Impacto funcional de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la DPA auricular

Tanto la FA aguda, como la crónica se caracterizan por un acortamiento de la DPA y del periodo refractario auricular (Schotten y cols., 2011). Bajo nuestras condiciones experimentales, los PAs registrados en miocitos de pacientes con FA crónica tenían una duración menor que los registrados en miocitos de pacientes en RS.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que la potenciación de los efectos de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre las corrientes iónicas auriculares inducida por la FA crónica puede atribuirse, principalmente, a la regulación al alza de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos auriculares que provoca la FA crónica. Sin embargo, hasta la fecha, no existían datos que explicaran el efecto de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica sobre las características del PA de los pacientes con FA crónica. Por ello, un objetivo importante del trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral era la comparación del efecto de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre los PAs registrados en miocitos de pacientes en RS y con FA crónica. Por esta razón, la concentración de ISO elegida para llevar a cabo

todos los experimentos electrofisiológicos fue de 1 nM, una concentración muy baja en comparación con la de otros estudios experimentales, en un intento de reproducir las concentraciones fisiológicas de catecolaminas circulantes, que se encuentran entre 0.4 y 1.6 nM (Bolger y cols., 2002).

#### 6.1. Efectos de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos en los PAs registrados en miocitos de pacientes en RS.

En los miocitos de pacientes en RS, el ISO prolongaba la DPA medida al 20, 50 y 90% de la repolarización, siendo este efecto más marcado en la  $DPA_{50}$ . Estos resultados están en consonancia con publicaciones anteriores (Redpath y cols., 2006) y pueden interpretarse en la luz de los efectos de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre cada corriente. De hecho, la duración de la fase de meseta del PA en RS está determinada principalmente por la amplitud de la  $I_{CaL}$ , cuyos efectos despolarizantes se equilibran con los efectos repolarizantes de la  $I_{to1}$  y la  $I_{Kur}$  (Van Wagoner y cols., 1999). Por lo tanto, el aumento en la densidad de la  $I_{CaL}$ , junto con la disminución de la  $I_{to1}$  producidos por la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos son, probablemente, los responsables de la prolongación de la  $DPA_{50}$  observada en las células de pacientes en RS.

Confirmamos esta hipótesis mediante un modelo matemático que había sido utilizado previamente para simular los efectos de la estimulación adrenérgica sobre el PA (Sampson y cols., 2008). Elegimos el modelo matemático de PA “tipo 3” desarrollado por Courtemanche y colaboradores (Courtemanche y cols., 1999), ya que de los tres modelos descritos, la forma triangular del “tipo 3” era prácticamente idéntica a la de los PAs registrados en nuestro laboratorio. Al introducir en el modelo nuestros resultados experimentales del efecto de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos en miocitos de RS (una disminución de la conductancia máxima de la  $I_{to1}$  del 10.6%, un aumento de las conductancias máximas de la  $I_{Ks}$  y de la  $I_{CaL}$  del 30% y del 13.5%, respectivamente y las modificaciones que produce el ISO sobre la cinética y la dependencia de voltaje de la activación de la  $I_{Ks}$ ), obtuvimos una prolongación de la DPA similar a la observada experimentalmente. Los efectos de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la  $I_{K1}$  no fueron tenidos en cuenta, ya que sólo aparecían a potenciales no fisiológicos, más negativos que el  $E_K$ .

## 6.2. Efectos de la estimulación de receptores $\beta_1$ -adrenérgicos en los PAs registrados en miocitos de pacientes con FA crónica

Los efectos del ISO sobre la DPA registrada en los miocitos procedentes de pacientes con FA crónica resultaron ser totalmente distintos a los observados en los miocitos de RS. Este resultado lo atribuimos a que el remodelado eléctrico producido por la FA crónica hace que la contribución de cada corriente a la DPA sea distinta a la que tenía en RS. En los miocitos de FA crónica, la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos producía una prolongación de la  $DPA_{20}$ , no modificaba la  $DPA_{50}$  y lo que es más importante, acortaba la  $DPA_{90}$ .

Estos resultados sugieren que la FA crónica, por un lado, disminuye de tal manera el papel de la  $I_{CaL}$  en la fase de meseta, que la inhibición de la  $I_{to1}$  producida por el ISO resulta en una prolongación durante la fase de meseta del PA. Por otro lado, la FA crónica, además de producir un marcado incremento de la  $I_{Ks}$ , potencia extraordinariamente su sensibilidad a la estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica. La  $I_{Ks}$  está principalmente implicada en la fase terminal de la repolarización (Volders y cols., 2003; Redpath y cols., 2006), por lo que ambas modificaciones producidas por la FA crónica, podrían ser las responsables del acortamiento de la  $DPA_{90}$  observado en presencia de estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica.

Para confirmar esta hipótesis, utilizamos de nuevo el modelo de PA “tipo 3”, incluyendo las modificaciones descritas por el autor para obtener un modelo de PA remodelado por FA crónica (es decir, considerar una reducción del 70% en la  $I_{CaL}$ , y del 50% en la  $I_{to1}$  y en la  $I_{Kur}$ ). Además, también incluimos otras modificaciones electrofisiológicas producidas por la FA crónica (un aumento del 100% en la  $I_{Ks}$  y en la  $I_{K1}$ ) descritas después de que el modelo se publicara. Una vez modificado el modelo, incorporamos los efectos del ISO sobre las conductancias máximas de la  $I_{to1}$  (disminución del 28.7%), de la  $I_{CaL}$  (aumento del 24%), y de la  $I_{Ks}$  (aumento del 52%) y las modificaciones en los parámetros de activación de la  $I_{Ks}$ . Al ejecutar el modelo, el resultado fue un acortamiento de la  $DPA_{90}$  de magnitud similar al observado experimentalmente.

Sin embargo, este resultado no descartaba que la disminución de la  $I_{CaL}$  fuera la única responsable de los efectos observados. Para responder a esta cuestión, utilizamos el mismo modelo de PA remodelado por FA crónica sin incluir el 100% de aumento de la  $I_{Ks}$ . En estas condiciones, el ISO no acortaba, sino que prolongaba la  $DPA_{90}$ , sugiriendo claramente que el aumento de la  $I_{Ks}$  estaba participando de forma crítica en el acortamiento de la  $DPA_{90}$  inducido por la estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica en los miocitos de FA crónica.

Estos resultados son novedosos e interesantes, considerando que la duración de la fase terminal de la repolarización es uno de los principales determinantes del periodo refractario auricular y se acepta de forma generalizada que el acortamiento del periodo refractario favorece la reentrada (Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011). Como se ha discutido anteriormente, la contribución de la  $I_{Ks}$  a la repolarización adquiere un papel crítico a frecuencias elevadas y bajo estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica, dos condiciones presentes en los pacientes con FA crónica. Esto hace razonable proponer que la potenciación de los efectos de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la  $I_{Ks}$  inducida por la FA crónica podría contribuir a la estabilización de la arritmia a largo plazo, debido al acortamiento del periodo refractario que provoca.

La hipótesis de que la estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica de la  $I_{Ks}$  podría contribuir a la FA había sido sugerida previamente por el grupo de Sampson y colaboradores, quienes, mediante un modelo de ratón transgénico para la  $I_{Ks}$ , demostraron que la administración *in vivo* de ISO predisponía a los ratones transgénicos a sufrir arritmias prolongadas, pero no a los ratones control, que carecen de  $I_{Ks}$  de forma fisiológica. Además, mediante un modelo matemático, confirmaron que la acumulación de canales en estado abierto generada por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica era la responsable del sustrato proarrítmico (Sampson y cols., 2008).

La inhibición de la  $I_{Ks}$  se ha propuesto como una aproximación terapéutica antiarrítmica más segura que la de la inhibición de otras corrientes repolarizantes, debido a que la  $I_{Ks}$  se hace más prominente en presencia de un tono simpático elevado (Gerlach, 2001; Gerlach, 2003; Salata y cols., 2004; Islam, 2010). Una inhibición selectiva de la  $I_{Ks}$  podría prolongar la DPA cuando la frecuencia de activación auricular es muy rápida (como en el caso de la FA) o en presencia de un tono simpático elevado, sin provocar los efectos proarrítmicos potencialmente letales que poseen los antiarrítmicos de clase III, ya que permitiría un bloqueo frecuencia-dependiente con efectos más homogéneos sobre la refractariedad auricular (Gerlach, 2003; Islam, 2010).

Por otro lado, se ha demostrado que la FA crónica produce un aumento heterogéneo de la innervación simpática cardiaca. Este aumento es más marcado en la AI que en la AD (Gould y cols., 2006), como confirman nuestros resultados electrofisiológicos y de expresión de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos.

Este hecho se traduciría en un aumento heterogéneo de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, favoreciendo que algunas zonas de la aurícula estuvieran sometidas a una mayor acción simpática que otras. Como resultado, se generarían heterogeneidades en la repolarización que

favorecerían la conducción fibrilatoria y la estabilidad de los rotores que mantienen la FA.

Por último, el aumento de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos producido por la FA crónica probablemente potencia todos los efectos deletéreos mediados por la activación de los mismos, como el estrés oxidativo, la fibrosis y la muerte celular por necrosis y apoptosis, lo que puede contribuir al remodelado estructural de las aurículas, aumentando el sustrato para el mantenimiento de la FA (Workman, 2010; Xiang, 2011; Feldman y cols., 2005). Además, la regulación al alza de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos inducida por la FA crónica alterará la  $[Ca^{2+}]_i$  y su manejo, con los consiguientes efectos proarrítmicos (promueve la actividad ectópica focal), pro-apoptóticos y pro-necróticos, favoreciendo el remodelado auricular y el mantenimiento de la FA.

## 7. Limitaciones del estudio

Todas las muestras utilizadas en este estudio provenían de la orejuela auricular, tejido que podría no ser representativo del resto de la aurícula. Además, debido a la limitada disponibilidad de muestras de OAI, los efectos del ISO sobre el PA sólo pudieron estudiarse en células de la OAD. Sin embargo, ya que la FA crónica aumenta la densidad de la  $I_{Ks}$  de forma similar en ambas aurículas y que el ISO aumenta de forma más marcada la  $I_{Ks}$  en la AI que en la AD, parece razonable asumir que el ISO también producirá un acortamiento de la DPA en la AI.

La presencia de enfermedades cardiovasculares concomitantes, el género de los pacientes y el tratamiento con determinados fármacos pueden modificar el proceso de remodelado iónico (Michael y cols., 2009; Schotten y cols., 2011). Por ello, en el momento de recogida de las muestras, también se tuvo en cuenta la historia clínica de los pacientes, que incluía sus datos electrocardiográficos, la presencia de FA y su duración, el tratamiento farmacológico y el grado de insuficiencia cardíaca según la clasificación de la *NYHA*. La distribución de los pacientes con valvulopatías y valvulopatías combinadas con isquemia cardíaca, principales patologías que pueden afectar al remodelado, no presentaba diferencias significativas entre el grupo de RS y FA crónica, así como tampoco había diferencias en el número de pacientes con insuficiencia cardíaca en ambos grupos y la clase funcional que presentaban. La única diferencia significativa entre los dos grupos se encontraba en el diámetro de la AI, que como es característico en esta patología, era mayor en pacientes con FA crónica.

También se ha descrito que la insuficiencia cardíaca y el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes

pueden modificar la expresión de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Tampoco había diferencias significativas en el número de pacientes en tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes en cada grupo.

No obstante, para determinar si alguna de las características clínicas o tratamientos de los pacientes afectaba de forma significativa al efecto del ISO sobre la  $I_{to1}$ , la  $I_{Ks}$  y la  $I_{K1}$ , se realizó un análisis de regresión lineal múltiple considerando la edad, el género, la presencia/ausencia de FA crónica, la fracción de eyección, la insuficiencia cardíaca (clase funcional III y IV), el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes y con IECAs. Se confirmó mediante este análisis que el único parámetro que afectaba de forma significativa al efecto del ISO sobre dichas corrientes era la presencia de FA crónica.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, los PAs fueron registrados en miocitos aislados y los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos fueron estimulados mediante una catecolamina sintética. Por lo tanto, nuestros resultados pueden requerir confirmación en condiciones que se aproximen más a las fisiológicas.





## **V. CONCLUSIONES**



De los resultados presentados en esta **TESIS DOCTORAL** se pueden extraer las siguientes **CONCLUSIONES**:

1. En condiciones fisiológicas se pueden diferenciar tres tipos de miocitos auriculares humanos en función de su tamaño y de las corrientes de  $K^+$  que participan en la repolarización durante la fase de meseta de los PAs. Estos tres tipos de células aparecen en un porcentaje idéntico en ambas aurículas.
2. La FA crónica modifica la distribución de los tres tipos celulares, disminuyendo en ambas aurículas por igual el porcentaje de células cuya principal corriente repolarizante durante la fase de meseta es la  $I_{to1}$ . Esta disminución se compensa, en la AD, con un aumento del porcentaje de células cuya principal corriente repolarizante durante la fase de meseta es la  $I_{Kur}$  y en la AI, con un aumento de aquéllas que presentan tanto  $I_{to1}$  como  $I_{Kur}$  durante la fase de meseta.
3. En condiciones fisiológicas la densidad de la  $I_{Kur}$  es mayor en las células de la AD que en las de la AI, es decir, existe un gradiente AD-AI de densidad de la  $I_{Kur}$ . Dicho gradiente se anula en las aurículas de los pacientes con FA crónica, puesto que en ellos, aunque disminuye la densidad de la  $I_{Kur}$  en ambas aurículas, esta disminución significativamente mayor en la AD que en la AI.
4. En condiciones fisiológicas, la densidad de la  $I_{to1}$  es idéntica en las células de ambas aurículas. En los miocitos de pacientes con FA crónica, la densidad de la  $I_{to1}$  disminuye marcadamente, siendo esta disminución mayor en la AI que en la AD, lo que genera un gradiente AI-AD de densidad de la  $I_{to1}$ . Por tanto, la FA crónica aumenta las diferencias electrofisiológicas entre las células de ambas aurículas, favoreciendo la heterogeneidad interauricular.

5. Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que la FA crónica produce un aumento de la  $I_{Ks}$  en ambas aurículas, que contribuye de forma crítica al acortamiento de la DPA observado en estos pacientes y, por tanto, al mantenimiento y a la recurrencia de la actividad fibrilatoria.

6. La FA crónica aumenta la expresión de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos en ambas aurículas, siendo este aumento mayor en la AI que en la AD. Como consecuencia, la inhibición de la  $I_{to}$  y los aumentos de la  $I_{Ks}$  y de la  $I_{CaL}$  producidos por la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, son significativamente más marcados en los miocitos de pacientes con FA crónica que en los de RS. Este aumento es, a su vez, significativamente mayor en la AI que en la AD.

7. El aumento de la  $I_{Ks}$  y el de la expresión de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos producidos por la FA crónica, provocan que el efecto de la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos sobre la DPA sea diferente; prolongándola en condiciones fisiológicas y abreviándola en los miocitos de pacientes con FA crónica. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la estimulación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos contribuye al acortamiento del periodo refractario auricular y a la perpetuación de la FA.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**





Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms  $I_{Kr}$  potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999; **97**:175-87.

Abraham RL, Yang T, Blair M, Roden DM, Darbar D. Augmented potassium current is a shared phenotype for two genetic defects associated with familial atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:181-90.

Abriel H. Cardiac sodium channel  $Na_v1.5$  and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:2-11.

Accili EA, Kiehn J, Yang Q, Wang Z, Brown AM, Wible BA. Separable  $Kv\beta$  subunit domains alter expression and gating of potassium channels. *J Biol Chem* 1997; **272**:25824-25831.

Aguilar M, Hart R, Pearce L. Anticoagulantes orales versus tratamiento antiplaquetario para la prevención de accidentes cerebrovasculares en pacientes con fibrilación auricular no valvular y sin antecedentes de accidente cerebrovascular ni de accidente isquémico transitorio. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011 Issue 4. Art. No.: CD006186

Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM. Accessory  $Kv\beta 1$  subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated  $K^+$  channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 2005; **96**:451-8.

Alboni P, Botto GL, Baldi N, Luzi M, Russo V, Gianfranchi L, Marchi P, Calzolari M, Solano A, Baroffio R, Gaggioli G. Outpatient treatment of recent-onset atrial fibrillation with the "pill-in-the-pocket" approach. *N Engl J Med* 2004; **351**:2384-91.

Aldhoun B, Melenovský V, Peichl P, Kautzner J. New insights into mechanisms of atrial fibrillation. *Physiol Res* 2010; **59**(1):1-12

Aldrich RW, Corey DP, Stevens CF. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* 1983; **306**:436-41.

Aldrich RW. Fifty years of inactivation. *Nature* 2001; **411**:643-4.

Ali IM, Sanalla AA, Clark V. Beta-blocker effects on postoperative atrial fibrillation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1997; **11**(6):1154-7.

Aliot E, Capucci A, Crijns HJ, Goette A, Tamargo J. Twenty-five years in the making: flecainide is safe and effective for the management of atrial fibrillation. *Europace* 2011; **13**(2):161-73

Allessie MA, Lammers WJEP, Bonke FIM, Hollen J. Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. En: *Cardiac electrophysiology and arrhythmias*. Zipes DP, Jalife J (Eds.) 1985; 265-276.

Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **103**:769-777

Allessie M, Asuma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodelling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; **54**:230-246.

Amarillo Y, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Maffie J, Kwon E, Covarrubias M, Rudy B. Ternary  $Kv4.2$  channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type  $K^+$  channels in cerebellar granule neurons. *J Physiol* 2008; **586**:2093-106.

Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch* 2010; **460**:223-37.

Amorós I, Jiménez-Jáimez J, Tercedor L, Barana A, Gómez R, de la Fuente MG, Dolz-Gaitón P, Alvarez M, Martínez-Espín E, Lorente JA, Melgares R, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2011; **8**:463-70.

Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996; **491**:31-50.

An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000; **403**:553-6.

- Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA, Liu DW. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res* 1991; **69**:1427-49.
- Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP Jr, Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu LF, Haïssaguerre M, Schimpf R, Borggrete M, Wolpert C. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 2007; **115**:442-9.
- Anumonwo JM, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:45-54.
- Apkon M, Nerbonne JM. Alpha 1-adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent  $K^+$  current in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**:8756-60.
- Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated  $K^+$  currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991; **97**:973-1011.
- Armstrong CM, Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 1973; **242**:459-61.
- Armstrong CM. Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys* 1974; **7**:179-210.
- Armstrong CM. Sodium channel and gating currents. *Physiol Rev* 1981; **61**:644-682.
- Ausma J, Wijffels M, Thoné F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997; **96**(9):3157-63.
- Avilés RJ, Martin DO, Pperson-Hansen C, Houghtaling PL, Rautaharju P, Kronmal RA, Tracy RP, Van Wagoner DR, Psaty BM, Lauer MS, Chung MK. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation* 2003; **108**: 3006-3010.
- Bähring R, Milligan CJ, Vardanyan V, Engeland B, Young BA, Dannenberg J, Waldschutz R, Edwards JP, Wray D, Pongs O. Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of Kvbeta subunits. *J Biol Chem* 2001; **276**:22923-9.
- Balser JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:599-613.
- Balser JR, Nuss HB, Romashko DN, Marban E, Tomaselli GF. Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol* 1996; **107**:643-58.
- Barana A, Amorós I, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP, Blázquez C, Guzmán M, Delpón E, Tamargo J. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc Res* 2010; **85**:56-67.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G.  $K_vLQT1$  and  $IsK$  (minK) proteins associate to form the  $I_{Ks}$  cardiac potassium current. *Nature* 1996; **384**:78-80.
- Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM. Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4  $\alpha$  subunit. *Circ Res* 1998; **83**:560-567.
- Bartos DC, Duchatelet S, Burgess DE, Klug D, Denjoy I, Peat R, Lupoglazoff JM, Fressart V, Berthet M, Ackerman MJ, January CT, Guicheney P, Delisle BP. R231C mutation in KCNQ1 causes long QT syndrome type 1 and familial atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2011; **8**:48-55.
- Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:55-64.
- Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989; **51**:367-84.
- Beaumont J, Davidenko N, Davidenko JM, Jalife J. Spiral waves in two-dimensional models of ventricular muscle: formation of a stationary core. *Biophys J* 1998; **75**:1-14.
- Beeler GW, Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol* 1977; **268**:177-210.

- Belloq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM, Baro I, Wilde AA. Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004; **109**:2394-2397.
- Belus A, Piroddi N, Ferrantini C, Tesi C, Cazorla O, Toniolo L, Drost M, Mearini G, Carrier L, Rossi A, Mugelli A, Cerbai E, van der Velden J, Poggesi C. Effects of chronic atrial fibrillation on active and passive force generation in human atrial myofibrils. *Circ Res* 2010; **107**: 144-152.
- Bendahhou S, Marionneau C, Haurogne K, Larroque MM, Derand R, Szuts V, Escande D, Demolombe S, Barhanin J. In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc Res* 2005; **67**:529-38.
- Berenfeld O, Zaitsev AV, Mironov SF, Pertsov AM, Jalife J. Frequency-dependent breakdown of wave propagation into fibrillatory conduction across the pectinate muscle network in the isolated sheep right atrium. *Circ Res* 2002; **90**:1173-1180.
- Berger M, Schweitzer P. Timing of thromboembolic events after electrical cardioversion of atrial fibrillation or flutter: a retrospective analysis. *Am J Cardiol* 1998; **82**: 1545-1547.
- Bénardeau A, Hatem SN, Rücker-Martin C, Le Grand B, Macé L, Dervanian P, Mercadier JJ, Coraboeuf E. Contribution of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange to action potential of human atrial myocytes. *Am J Physiol*. 1996; **271**(3 Pt 2):H1151-61
- Bers DM, Pérez-Reyes E. Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca<sup>2+</sup> influx and intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:339-360.
- Bertaso F, Sharpe CC, Hendry BM, James AF. Expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human atrium. *Basic Res Cardiol* 2002; **97**:424-433.
- Bettoni M, Zimmermann M. Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2002;**105**:2753-9.
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993; **73**:379-85.
- Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000; **80**:555-92.
- Bezanilla F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 2002; **120**:465-73.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 2000; **25**:177-90.
- Bidaud I, Lory P. Hallmarks of the channelopathies associated with L-type calcium channels: A focus on the Timothy mutations in Ca<sub>v</sub>1.2 channels. *Biochimie* 2011; **93**:2080-6.
- Bjerregaard P, Gussak I. Short QT syndrome: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; **2**:84-87.
- Blaauw Y, Gögelein H, Tieleman RG, van Hunnik A, Schotten U, Allessie MA. "Early" class III drugs for the treatment of atrial fibrillation: efficacy and atrial selectivity of AVE0118 in remodeled atria of the goat. *Circulation* 2004; **110**:1717-24
- Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005; **115**:3306-17.
- Boldt A, Wetzel U, Weigl J, Garbade J, Lauschke J, Hindricks G, Kottkamp H, Gummert JF, Dhein S. Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003; **42**:1785-92.
- Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, Weigl J, Gummert J, Hindricks G, Kottkamp H, Dhein S. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart* 2004; **90**: 400-405
- Bolger AP, Sharma R, Li W, Leenarts M, Kalra PR, Kemp M, Coats AJ, Anker SD, Gatzoulis MA. Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease. *Circulation* 2002; **106**:92-99.
- Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994; **331**(19):1286-92

- Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999; **44**: 121-131.
- Bowditch H. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskel fagern des Herzens ziegen. *Arb Physiol Anstalt* 1871; **6**:139-176.
- Boyden PA, Tilley LP, Pham TD, Liu SK, Fenoglio JJ Jr, Wit AL. Effects of left atrial enlargement on atrial transmembrane potentials and structure in dogs with mitral valve fibrosis. *Am J Cardiol* 1982; **49**:1896-1908.
- Boyett MR. A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in the sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1981; **319**:1-22.
- Brehm P, Eckert R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science* 1978; **202**:1203-6.
- Breitwieser GE, Szabo G. Mechanism of muscarinic receptor-induced  $K^+$  channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 1988; **91**:469-493.
- Brendel J, Peukert S. Blockers of the Kv1.5 channels for treatment of atrial arrhythmias. *Exp Opin Ther Pat* 2002; **12**:1589-1598.
- Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev.* 1999; **51**:651-689.
- Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. Cardiac Adrenoceptors: Physiological and Pathophysiological Relevance. *J Pharmacol Sci* 2006; **100**, 323-337.
- Brown AM, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol* 1981; **318**:479-500.
- Bruins P, Te VH, Yazdanbakhsh AP, Jansen PG, Van Hardevelt FW, De Beaumont EM, Wildevuur CR, Eijssman L, Trouwborst A, Hack CE. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia. *Circulation* 1997; **96**: 3542-3548.
- Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden death associated with short QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004; **109**:30-35.
- Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Wietes M, Grandjean JG, Wilde AA, Van Gilst WH, Crijns HJ. Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for  $K^+$  channels. *J Am Coll Cardiol* 2001; **37**:926-932.
- Brundel BJ, Ausma J, van Gelder IC, Van der Want JJ, van Gilst WH, Crijns HJ, Henning RH. Activation of proteolysis by calpains and structural changes in human paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; **54**:380-389.
- Buraei Z, Yang J. The  $\beta$  subunit of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Physiol Rev* 2010; **90**:1461-506.
- Burashnikov A, Mannava S, Antzelevitch C. Transmembrane action potential heterogeneity in the canine isolated arterially perfused right atrium: effect of  $I_{Kr}$  and  $I_{Kur}/I_{to}$  block. *Am J Physiol* 2004; **286**:H2393-H2400.
- Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, Borggrefe M, Häissaguerre M, Kanter R, Pollevick GD, Guerchicoff A, Laiño R, Marieb M, Nademanee K, Nam GB, Robles R, Schimpf R, Stapleton DD, Viskin S, Winters S, Wolpert C, Zimmern S, Veltmann C, Antzelevitch C. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2010; **7**:1872-82.
- Burstein B, Qi XY, Yeh YH, Calderone A, Nattel S. Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: a novel consideration in atrial remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007; **76**(3):442-52.
- Busch AE, Busch GL, Ford E, Suessbrich H, Lang HJ, Greger R, Kunzelmann K, Attali B, Stuhmer W. The role of  $IsK$  protein in the specific pharmacological properties of the  $I_{Ks}$  channel complex. *Br J Pharmacol* 1997; **122**:187-189.

Caballero R, Moreno I, González T, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 2002; **56**:104-17.

Caballero R, Moreno I, González T, Arias C, Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 2003; **107**:889-895.

Caballero R, Gómez R, Moreno I, Núñez L, González T, Arias C, Guizy M, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current. *Cardiovasc Res* 2004; **62**:86-95.

Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula JA, Tamargo J, Delpón E. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**:15631-6.

Camm AJ (Coordinador). Grupo de Trabajo para el Manejo de la Fibrilación Auricular de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC). Guías de práctica clínica para el manejo de la fibrilación auricular. 2ª ed corregida. 8 de abril de 2011. ESC; desarrolladas con la contribución especial de European Heart Rhythm Association (EHRA). Aprobado por European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Rev Esp Cardiol*. 2010; **63**(12):1483.e1-e83.

Camm AJ, Capucci A, Hohnloser SH, Torp-Pedersen C, Van Gelder IC, Mangal B, Beatch G; AVRO Investigators. A randomized active-controlled study comparing the efficacy and safety of vernakalant to amiodarone in recent-onset atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2011; **57**(3):313-21.

Campbell DL, Rasmusson RL, Qu Y, Strauss HC. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis. *J Gen Physiol* 1993a; **101**:571-601.

Campbell DL, Qu Y, Rasmusson RL, Strauss HC. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. II. Closed state reverse use-dependent

block by 4-aminopyridine. *J Gen Physiol* 1993b; **101**:603-626.

Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**: 1947-1958.

Cannon SC, Brown RH Jr, Corey DP. A sodium channel defect in hyperkalemic periodic paralysis: potassium-induced failure of inactivation. *Neuron* 1991; **6**:619-26.

Cardin S, Li D, Thorin-Trescases N, Leung TK, Thorin E, Nattel S. Evolution of the atrial fibrillation substrate in experimental congestive heart failure: angiotensin-dependent and independent pathways. *Cardiovasc Res* 2003; **60**: 315-325

Carlsson J, Miketic S, Windeler J, Cuneo A, Haun S, Micus S, Walter S, Tebbe U; STAF Investigators. Randomized trial of rate-control versus rhythm-control in persistent atrial fibrillation: the Strategies of Treatment of Atrial Fibrillation (STAF) study. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**:1690-6.

Carmeliet E, Vereecke J. Electrogenesis of the action potential. En: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Berne R, Speralakis N, Geiger S. *American Physiological Society* 1979: 269-334.

Carmeliet E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch* 1987; **408**:18-26.

Carmeliet E. Mechanisms and control of repolarization. *Eur Heart J* 1993; **14**:3-13.

Castellino RC, Morales MJ, Strauss HC, Rasmusson RL. Time- and voltage-dependent modulation of a Kv1.4 channel by a beta-subunit (Kv beta 3) cloned from ferret ventricle. *Am J Physiol* 1995; **269**:H385-91.

Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; **26**:13-25.

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships

of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005a; **57**:397-409.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005b; **57**:411-25.

Cens T, Mangoni ME, Richard S, Nargeot J, Charnet P. Coexpression of the beta2 subunit does not induce voltage-dependent facilitation of the class C L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Pflugers Arch* 1996; **431**:771-4.

Cerrone M, Priori SG. Genetics of sudden death: focus on inherited channelopathies. *Eur Heart J* 2011; **32**:2109-18.

Cerrone M, Napolitano C, Priori SG. Genetics of ion-channel disorders. *Curr Opin Cardiol* 2012; **27**:242-52.

Cha TJ, Ehrlich JR, Chartier D, Qi XY, Xiao L, Nattel S. Kir3-based inward rectifier potassium current: potential role in atrial tachycardia remodeling effects on atrial repolarization and arrhythmias. *Circulation* 2006; **113**: 1730-1737.

Chan PJ, Osteen JD, Xiong D, Bohnen MS, Doshi D, Sampson KJ, Marx SO, Karlin A, Kass RS. Characterization of KCNQ1 atrial fibrillation mutations reveals distinct dependence on KCNE1. *J Gen Physiol* 2012; **139**:135-44.

Chang CJ, Chen YC, Kao YH, Lin YK, Chen SA, Chen YJ. Dabigatran and Thrombin Modulate Electrophysiological Characteristics of Pulmonary Vein and Left Atrium. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012; **5**(6):1176-83.

Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; **392**:293-6.

Chen H, Kim LA, Rajan S, Xu S, Goldstein SA. Charybdotoxin binding in the  $I_{Ks}$  pore demonstrates two minK subunits in each channel complex. *Neuron* 2003a; **40**:15-23

Chen SA, Hsieh MH, Tai CT, Tsai CF, Prakash VS, Yu WC, Hsu TL, Ding YA, Chang MS. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the pulmonary veins: electrophysiological responses, and effects of radiofrequency ablation. *Circulation* 1999; **100**:1879-1886.

Chen Y, Chen SA, Chen Y, Yeh HI, Chan P, Chang MS, Lin CI. Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **104**: 2849-2854.

Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003b; **299**:251-254.

Chen YJ, Chen SA, Chang MS, Lin CI. Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog: implication for the genesis of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2000; **100**:1879-1886.

Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackrman MJ, Kass RS. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:20990-20995.

Cheng WW, D'Avanzo N, Doyle DA, Nichols CG. Dual-Mode Phospholipid Regulation of Human Inward Rectifying Potassium Channels *Biophys J* 2011; **100**:620-628

Cheung DW. Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea-pig. *J Physiol* 1981; **314**:251-254.

Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 2002; **3**:115-21.

Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated  $\text{K}^{+}$  channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**:5092-5.

Choi KL, Mossman C, Aubé J, Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron* 1993; **10**:533-41.

Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1 K<sup>+</sup> channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 1997; **16**:5472-5479.

Christ T, Boknik P, Wöhrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF, Knaut M, Schmitz W, Ravens U, Dobrev D. L-type Ca<sup>2+</sup> current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation* 2004; **110**:2651-2657.

Christ T, Wettwer E, Voigt N, Hála O, Radicke S, Matschke K, Várro A, Dobrev D, Ravens U. Pathology-specific effects of the IKur/Ito/IK<sub>ACh</sub> blocker AVE0118 on ion channels in human chronic atrial fibrillation. *Br J Pharmacol* 2008; **154**:1619-1630.

Christ T, Molenaar P, Klenowski PM, Ravens U, Kaumann AJ. Human atrial  $\beta_{1L}$ -adrenoceptor but not  $\beta_2$ -adrenoceptor activation increases force and Ca(2+) current at physiological temperature. *Br J Pharmacol*. 2011; **162**(4):823-839.

Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 1990; **4**:405-11.

Cipollone F, Fazio M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Uchino S, Spigonardo F, Di Nisio M, Cuccurullo F, Mezzetti A, Porreca E. Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* 2004; **35**: 2253-2257.

Clarkson CW, Matsubara T, Hondeghem LM. Slow inactivation of  $V_{max}$  in guinea-pig ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1984; **247**:H645-H654.

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **868**:233-85.

Colinas O, Gallego M, Setién R, López-López JR, Pérez-García MT, Casis O. Differential modulation of Kv4.2 and Kv4.3 channels by calmodulin-dependent protein kinase II in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291**:H1978-87.

Comtois P, Kneller J, Nattel S. Of circles and spirals: bridging the gap between the leading circle and spiral wave concepts of cardiac reentry. *Europace* 2005; **7** Suppl 2:10-20

Cong H, Li X, Ma L, Jiang H, Mao Y, Xu M. Angiotensin II receptor type 1 is upregulated in atrial tissue of patients with rheumatic valvular disease with atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; **140**(2):298-304.

Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, Pogue J, Reilly PA, Themeles E, Varrone J, Wang S, Alings M, Xavier D, Zhu J, Diaz R, Lewis BS, Darius H, Diener HC, Joyner CD, Wallentin L; RE-LY Steering Committee and Investigators. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009; **361**(12):1139-51

Conti LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 2001; **276**:41270-41278.

Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem*. 2007; **76**: 481-511.

Coraboeuf E, Otsuka M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956; **234**:441-444.

Coraboeuf E, Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflugers Arch* 1982; **392**:352-9.

Cordeiro JM, Marieb M, Pfeiffer R, Calloe K, Burashnikov E, Antzelevitch C. Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2009; **46**:695-703.

Corley SD, Epstein AE, DiMarco JP, Domanski MJ, Geller N, Greene HL, Josephson RA, Kellen JC, Klein RC, Krahn AD, Mickel M, Mitchell LB, Nelson JD, Rosenberg Y, Schron E, Shemanski L, Waldo AL, Wyse DG; AFFIRM Investigators. Relationships between sinus rhythm, treatment, and survival in the Atrial Fibrillation Follow-Up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) Study. *Circulation* 2004; **109**:1509-13.

Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass RS. Secondary structure of the human cardiac Na<sup>+</sup> channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002; **277**:9233-41.

Cosío FG, Delpón E. New antiarrhythmic drugs for atrial flutter and atrial fibrillation: a conceptual breakthrough at last?. *Circulation* 2002; **105**(3):276-8.

Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:477-489.

Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* 1991; **7**:763-73.

Cox JL, Canavan TE, Schuessler RB, Cain ME, Lindsay BD, Stone C, Smith PK, Corr PB, Boineau JP. The surgical treatment of atrial fibrillation. II. Intraoperative electrophysiologic mapping and description of the electrophysiologic basis of atrial flutter and atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; **101**:406-426.

Cranefield P, Aronson R. *Cardiac Arrhythmias: The role of trigger activity and other mechanisms*. Cranefield & Aronson. Futura 1975.

Crystal E, Garfinkle MS, Connolly SS, Ginger TT, Sleik K, Yusuf SS. Interventions for preventing post-operative atrial fibrillation in patients undergoing heart surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; **4**:CD003611.

Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV. Cyclic AMP regulates the HERG K<sup>+</sup> channel by dual pathways. *Curr Biol* 2000; **10**:671-674.

Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995; **80**:795-803.

Daoud EG, Marcovitz P, Knight BP, Goyal R, Man KC, Strickberger SA, Armstrong WF, Morady F. Short-term effect of atrial fibrillation on atrial contractile function in humans. *Circulation* 1999; **99**:3024-3027.

Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL Jr, Roden DM. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 2008; **117**:1927-35.

Das S, Makino S, Melman YF, Shea MA, Goyal SB, Rosenzweig A, Macrae CA, Ellinor PT. Mutation in the S3 segment of KCNQ1 results in familial lone atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009; **6**:1146-53.

Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, Dimagno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA, Davidson N. Atrial G protein-activated K<sup>+</sup> channel: Expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**:10235-10239.

De Arcangelis V, Liu S, Zhang D, Soto D, Xiang Y. Equilibrium between Adenylyl Cyclase and Phosphodiesterase Patterns Adrenergic Agonist Dose-Dependent Spatiotemporal cAMP/Protein Kinase A Activities in Cardiomyocytes. *Mol Pharmacol*. 2010 ;**78**: 340–349.

De Bruin ML, Pettersson M, Meyboom RH, Hoes AW, Leufkens HG. Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur Heart J* 2005; **26**:590-597.

De Denus S, Sanoski CA, Carlsson J, Opolski G, Spinler SA. Rate vs rhythm control in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 2005; **165**:258-62.

De Vos CB, Pisters R, Nieuwlaat R, Prins MH, Tieleman RG, Coelen RJ, van den Heijkant AC, Allessie MA, Crijns HJ. Progression from paroxysmal to persistent atrial fibrillation clinical correlates and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**:725-31.

De Vuyst E, Boengler K, Antoons G, Sipido KR, Schulz R, Leybaert L. Pharmacological modulation of connexin-formed channels in cardiac pathophysiology. *Br J Pharmacol* 2011; **163**(3):469-83.

De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* 1994; **13**:495-503.



Deal KK, England SK, Tamkun MM. Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol Rev* 1996; **76**:49-67.

Decher N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yüksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B. hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 2001; **52**:255-64.

Decher N, Barth AS, Gonzalez T, Steinmeyer K, Sanguinetti MC. Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents. *J Physiol* 2004; **557**:761-72.

Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier  $K^+$  current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995; **76**:223-235.

Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008; **1**:209-18.

Delpón E, Tamargo J. Electrofisiología cardíaca. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres JAF. McGraw-Hill 2010.

Dennis A, Wang L, Wan X, Ficker E. hERG channel trafficking: Novel targets in drug-induced long QT syndrome. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**:1060-1063.

Dernellis J, Panaretou M. C-reactive protein and paroxysmal atrial fibrillation: evidence of the implication of an inflammatory process in paroxysmal atrial fibrillation. *Acta Cardiol* 2001; **56**:375-80.

Deschênes I, Tomaselli GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* 2002; **528**:183-8.

Deschênes I, Arroudas AA, Jones SP, Tomaselli GF. Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Navβ1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals

a functional association between  $Na^+$  and  $I_{to}$  currents. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **45**:336-346.

Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current  $I_{K1}$  controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005; **2**:316-24.

Di Bona GF Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; **11** 197-200

Di Diego JM, Sun ZQ, Antzelevitch C.  $I_{to}$  and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am J Physiol* 1996; **271**:H548-61.

Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Pérez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* 2002; **106**:2004-11.

Di Francesco D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res* 2006; **53**:399-406.

Dilks D, Ling HP, Cockett M, Sokol P, Numann R. Cloning and expression of the human Kv4.3 potassium channel. *J Neurophysiol* 1999; **81**:1974-1977.

Diochot S, Drici MD, Moinier D, Fink M, Lazdunski M. Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of  $I_{to1}$  in cardiac electrogenesis. *Br J Pharmacol* 1999; **126**:251-63.

Dimmer C, Tavernier R, Gjorgov N, Van Nooten G, Clement DL, Jordaens L. Variations of autonomic tone preceding onset of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol* 1998; **82**:22-25.

Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. Role of the Kv4.3  $K^+$  channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996; **79**:659-68.

Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hála O, Doerfel C, Christ T, Schüler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying  $K^+$  current  $[I(K,ACh)]$  in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced  $I(K,ACh)$

and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001; **104**:2551-2557.

Dobrev D, Ravens U. Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2003; **54**:397-404.

Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. The G protein-gated potassium current  $I_{K,ACh}$  is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005; **112**:3697-3706.

Dobrev D. Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation. *Herz* 2006; **31**:108-12.

Dobrev D, Wehrens XH. Calmodulin kinase II, sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak, and atrial fibrillation. *Trends Cardiovasc Med* 2010; **20**(1):30-4

Dorian P, Pinter A, Mangat I, Korley V, Cvitkovic SS, Beatch GN. The effect of vernakalant (RSD1235), an investigational antiarrhythmic agent, on atrial electrophysiology in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; **50**:35-40.

Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of  $K^{+}$  conduction and selectivity. *Science* 1998; **280**:69-77.

Drolet B, Simard C, Mizoue L, Roden DM. Human cardiac potassium channel DNA polymorphism modulates access to drug binding site and causes drug resistance. *J Clin Invest* 2005; **115**:2209-2213.

Dudel J, Peper K, Rüdél R, Trautwein W. The potassium component of membrane current in Purkinje fibers. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1967; **296**:308-27.

Duffy HS. Cardiac connections--the antiarrhythmic solution? *N Engl J Med*. 2008; **358**(13):1397-8.

Dupont E, Ko Y, Rothery S, Coppén SR, Baghai M, Haw M, Severs NJ. The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **103**: 842-849.

Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by

an inactivation gate peptide. *Neuron* 1994; **12**:1041-8.

Ehrlich JR, Zicha S, Coutu P, Hébert TE, Nattel S. Atrial fibrillation-associated minK38G/S polymorphism modulates delayed rectifier current and membrane localization. *Cardiovasc Res* 2005; **67**:520-8.

El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T, Carrier L, Knaut M, Ravens U, Dobrev D. Molecular determinants of altered  $Ca^{2+}$  handling in human chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2006; **114**: 670-680.

El-Haou S, Balse E, Neyroud N, Dilanian G, Gavillet B, Abriel H, Coulombe A, Jeromin A, Hatem SN. Kv4 potassium channels form a tripartite complex with the anchoring protein SAP97 and CaMKII in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009; **104**:758-69.

Elvan A, Huang XD, Pressler ML, Zipes DP. Radiofrequency catheter ablation of the atria eliminates pacing-induced sustained atrial fibrillation and reduces connexin 43 in dogs. *Circulation* 1997; **96**:1675-1685

England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM. Characterization of a voltage-gated  $K^{+}$  channel  $\beta$  subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:6309-6313.

Faber GM, Rudy Y. Action potential and contractility changes in  $[Na^{+}]_i$  overloaded cardiac myocytes: a simulation study. *Biophys J*. 2000; **78**: 2392-2404

Fast VG, Kleber AG. Role of wavefront curvature in propagation of cardiac impulse. *Cardiovasc Res* 1997; **33**:258-271.

Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned  $K^{+}$  channel current. *Circ Res* 1993; **73**:210-216.

Feldman DS, Carnes CA, Abraham WT, Bristow MR. Mechanisms of disease: betaadrenergic receptors--alterations in signal transduction and pharmacogenomics in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; **2**:475-483.

- Feng J, Wang Z, Li GR, Nattel S. Effects of class III antiarrhythmic drugs on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997a; **281**:384-92.
- Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997b; **80**:572-579.
- Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: Properties and consequences. *Am J Physiol* 1998a; **275**:H1717-H1725.
- Feng J, Yue L, Wang Z, Nattel S. Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ Res* 1998b; **83**:541-551.
- Fermini B, Wang Z, Duan D, Nattel S. Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol* 1992; **263**:H1747-54.
- Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science* 1994; **266**:1068-72.
- Finley MR, Li Y, Hua F, Lillich J, Mitchell KE, Ganta S, Gilmour RF Jr, Freeman LC. Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **283**:H126-38.
- Firouzi M, Ramanna H, Kok B, Jongsma HJ, Koeleman BP, Doevendans PA, Groenewegen WA, Hauer RN. Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res* 2004; **95**: e29-e33.
- Folander K, Smith JS, Antanavage J, Bennett C, Stein RB, Swanson R. Cloning and expression of the delayed-rectifier IsK channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**:2975-9.
- Fozzard HA, Hiraoka M. The positive dynamic current and its inactivation properties in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1973; **234**:569-86.
- Fozzard HA, January CT, Makielski JC. New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circ Res* 1985; **56**:475-85.
- Fozzard HA, Hanck DA, Makielski JC, Scanley BE, Sheets MF. Sodium channels in cardiac Purkinje cells. *Experientia* 1987; **43**:1162-8.
- Franqueza L, Longobardo M, Vicente J, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* 1997; **81**:1053-64.
- Frost L, Hune LJ, Vestergaard P. Overweight and obesity as risk factors for atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study. *Am J Med* 2005; **118**:489-495.
- Frustaci A, Caldarulo M, Buffon A, Bellocchi F, Fenici R, Melina D. Cardiac biopsy in patients with "primary" atrial fibrillation. Histologic evidence of occult myocardial diseases. *Chest* 1991; **100**(2):303-6.
- Frustaci A, Chimenti C, Bellocchi F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 1997; **96**(4):1180-4.
- Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines; European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society.. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation. *Circulation* 2006; **114**: e257-354.
- Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, Léger J, Charpentier F, Christ T, Dobrev D, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005; **112**: 471-481.

Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007; **582**:675-693.

Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, Grossi S, Richiardi E, Borggreffe M. Short QT syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation* 2003; **108**:965-970.

García-Cosío F. What exactly is atrial fibrillation and how do we diagnose it? *Rev Esp Cardiol*. 2007; **60**(2):93-6.

Gardner LA, Tavalin SJ, Goehring AS, Scott JD, Bahouth SW. AKAP79-mediated targeting of the cyclic AMP-dependent protein kinase to the beta1-adrenergic receptor promotes recycling and functional resensitization of the receptor. *J Biol Chem*. 2006; **281**(44):33537-33553.

Garrey WE. Auricular fibrillation. *Physiol Rev* 1924; **4**:215-50.

Gelband H, Bush HL, Rosen MR, Myerburg RJ, Hoffman BF. Electrophysiologic properties of isolated preparations of human atrial myocardium. *Circ Res* 1972; **30**:293-300.

George AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 2005; **115**:1990-9.

Gerlach U. IKs channel blockers: Potential antiarrhythmic agents. *Drugs Future* 2001; **26**:473-484.

Gerlach U. Blockers of the slowly delayed rectifier potassium IKs channel: Potential antiarrhythmic agents. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2003; **1**: 243-252.

Gettes LS, Reuter H. Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J Physiol* 1974; **240**:703-724.

Giles WR, Imaizumi Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 1988; **405**:123-145.

Gintant GA, Dwyer NB, Cohen IS. Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys J* 1984; **45**:509-512.

Girmatsion Z, Biliczki P, Takac I, Schwerthelm C, Hohnloser SH, Ehrlich JR. N-terminal arginines modulate plasma-membrane localization of Kv7.1/KCNE1 channel complexes. *PLoS One*. 2011; **6**:e26967.

Giudicessi JR, Ye D, Tester DJ, Crotti L, Mugione A, Nesterenko VV, Albertson RM, Antzelevitch C, Schwartz PJ, Ackerman MJ. Transient outward current ( $I_{to}$ ) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2011; **8**:1024-32.

Godreau D, Vranckx R, Maguy A, Rücker-Martin C, Goyenvalle C, Abdelshafy S, Tessier S, Couétil JP, Hatem SN. Expression, regulation and role of the MAGUK protein SAP-97 in human atrial myocardium. *Cardiovasc Res* 2002; **56**:433-42.

Goette A, Arndt M, Rocken C, Staack T, Bechtloff R, Reinhold D, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Calpains and cytokines in fibrillating human atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **283**:H264-H272.

Goldin AL. Evolution of voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels. *J Exp Biol* 2002; **205**:575-84.

Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 1943; **27**:37-60.

Gómez R, Núñez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1 + minK channels. *Br J Pharmacol* 2005; **146**:146-61.

Goldsmith SR, Sobotka PA, Bart BA. The sympathorenal axis in hypertension and heart failure. *J Card Fail*. 2010; **16**(5):369-73

Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong XQ, Shao Q, Liu X, Veinot JP, Tang AS, Stewart AF, Tesson F, Klein GJ, Yee R, Skanes AC, Guiraudon GM, Ebihara L, Bai D. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2006; **354**(25):2677-88.

Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F, Almendral J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide increases cardiac  $I_{K1}$  by

nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009; **105**:383-92.

Gómez-Lagunas F, Armstrong CM. Inactivation in ShakerB K<sup>+</sup> channels: a test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys J* 1995; **68**:89-95.

González T, Navarro-Polanco R, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpón E, Tamargo J, Tamkun MM, Valenzuela C. Assembly with the Kvβ1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels. *Mol Pharmacol* 2002; **62**:1456-1463.

Gosselink AT, Crijns HJ, Hamer HP, Hillege H, Lie KI. Changes in left and right atrial size after cardioversion of atrial fibrillation: role of mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol* 1993; **22**:1666-1672.

Gould PA, Yui M, McLean C, Finch S, Marshall T, Lambert GW, Kaye DM. Evidence for increased atrial sympathetic innervation in persistent human atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2006; **29**:821-829.

Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest* 2002; **110**:1201-9.

Greiser M, Halaszovich CR, Frechen D, Boknik P, Ravens U, Dobrev D, Lückhoff A, Schotten U. Pharmacological evidence for altered src kinase regulation of ICa,L in patients with chronic atrial fibrillation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2007; **375**:383-392.

Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy G. Pharmacological characterization of five cloned voltage gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 1994; **45**:1227-1234.

Guo W, Xu H, London B, Nerbonne JM. Molecular basis of transient outward K<sup>+</sup> current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 1999; **521**:587-99.

Gussak I, Brugada P, Brugada J, Wright RS, Kopecky SL, Chaitman BR, Bjerregaard P.

Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* 2000; **94**:99-102.

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; **57**:473-508.

Hagens VE, Vermeulen KM, TenVergert EM, Van Veldhuisen DJ, Bosker HA, Kamp O, Kingma JH, Tijssen JG, Crijns HJ, Van Gelder IC; RACE study group. Rate control is more cost-effective than rhythm control for patients with persistent atrial fibrillation-results from the Rate Control versus Electrical cardioversion (RACE) study. *Eur Heart J* 2004; **25**:1542-9.

Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988; **395**:233-53.

Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998; **339**:659-666.

Hancox JC, Levi AJ, Witchel HJ. Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K<sup>+</sup> current during the cardiac ventricular action potential. *Pflügers Arch* 1998; **436**:843-853.

Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, Shah R. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2000; **47**:219-233.

He M, Bodi I, Mikala G, Schwartz A. Motif III S5 of L-type calcium channels is involved in the dihydropyridine binding site. A combined radioligand binding and electrophysiological study. *J Biol Chem* 1997; **272**:2629-33.

Heath BM, Terrar DA. Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium

current, IKr, through a reduction in C-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 2000; **522**:391–402.

Hedin KE, Lim NF, Clapham DE. Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit that permits GIRK1 expression of I<sub>K,Ach</sub> currents in oocytes. *Neuron* 1996; **16**:423–429.

Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BH, Stijnen T, Lip GY, Witteman JC. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006; **27**:949–953.

Heginbotham L, Lu Z, Abramson R, MacKinnon R. Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys J* 1994; **66**:1061–1067.

Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992; **356**:441–3.

Henrion U, Zumhagen S, Steinke K, Strutz-Seeböhm N, Stallmeyer B, Lang F, Schulze-Bahr E, Seeböhm G. Overlapping cardiac phenotype associated with a familial mutation in the voltage sensor of the KCNQ1 channel. *Cell Physiol Biochem* 2012; **29**:809–18.

Henry WL, Morganroth J, Pearlman AS, Clark CE, Redwood DR, Itscoitz SB, Epstein SE. Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation* 1976; **53**:273–279.

Hering S, Aczél S, Grabner M, Döring F, Berjukow S, Mitterdorfer J, Sinnegger MJ, Striessnig J, Degtiar VE, Wang Z, Glossmann H. Transfer of high sensitivity for benzothiazepines from L-type to class A (BI) calcium channels. *J Biol Chem* 1996; **271**:24471–5.

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010; **90**:291–366.

Hille B. (Ed.). *Ion channels of excitable membranes*. 3<sup>a</sup> Edición. Ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA (USA). 2001

Hilliard FA, Steele DS, Laver D, Yang Z, Le Marchand SJ, Chopra N, Piston DW, Huke S,

Knollmann BC. Flecainide inhibits arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> waves by open state block of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels and reduction of Ca<sup>2+</sup> spark mass. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**(2):293–301.

Hiraoka M, Kawano S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1989; **410**:187–212.

Hirschberg B, Rovner A, Lieberman M, Patlak J. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* 1995; **106**:1053–1068.

Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993; **362**:31–8.

Hobbs WJ, Fynn S, Todd DM, Wolfson P, Galloway M, Garratt CJ. Reversal of atrial electrical remodeling after cardioversion of persistent atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2000; **101**:1145–51.

Hocini M, Ho SY, Kawara T, Linnenbank AC, Potse M, Shah D, Jaïs P, Janse MJ, Haïssaguerre M, De Bakker JM. Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. *Circulation*. 2002 May 21; **105**:2442–8.

Hocini M, Nault I, Wright M, Veenhuyzen G, Narayan SM, Jaïs P, Lim KT, Knecht S, Matsuo S, Forclaz A, Miyazaki S, Jadidi A, O'Neill MD, Sacher F, Clémenty J, Haïssaguerre M. Disparate evolution of right and left atrial rate during ablation of long lasting persistent atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**:1007–1016.

Hockerman GH, Johnson BD, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 1995; **270**:22119–22.

Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952a; **117**:500–44.

Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952b; **116**:473–96.

- Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol* 1949; **108**:37-77.
- Hodgson-Zingman DM, Karst ML, Zingman LV, Heublein DM, Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, de Andrade M, Burnett JC Jr, Olson TM. Atrial natriuretic peptide frameshift mutation in familial atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2008; **359**: 158-165.
- Hoffman B, Cranefield P. *Electrophysiology of the heart*. Hoffman B, Cranefield P. McGraw-Hill 1960.
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for  $\text{Ca}^{2+}$  channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994; **17**:399-418.
- Hohnloser SH, Kuck KH, Lilienthal J. Rhythm or rate control in atrial fibrillation- Pharmacological Intervention in Atrial Fibrillation (PIAF): a randomised trial. *Lancet* 2000; **356**:1789-94.
- Holmes DR, Reddy VY, Turi ZG, Doshi SK, Sievert H, Buchbinder M, Mullin CM, Sick P. Percutaneous closure of the left atrial appendage versus warfarin therapy for prevention of stroke in patients with atrial fibrillation: a randomised noninferiority trial. *Lancet* 2009; **374**:534-542.
- Hondeghem LM. Validity of  $V_{\max}$  as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys J* 1978; **23**:147-152.
- Hong K, Bjerregaard P, Gussak I, Brugada R. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; **4**:394-396.
- Horie M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1987; **387**:251-72.
- Horn R, Patlak J, Stevens CF. Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature* 1981; **291**:426-427.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1990; **250**:533-8.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in Shaker  $\text{K}^{+}$  channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 1991; **7**:547-56.
- Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan NY, Jan LY. Evidence that direct binding of Gbg to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying  $\text{K}^{+}$  channel is important for channel activation. *Neuron* 1995; **15**:1133-1143.
- Huang B, Qin D, El-Sherif N. Early down-regulation of  $\text{K}^{+}$  channel genes and currents in the postinfarction heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000; **11**:1252-1261.
- Irisawa G, Hagiwara N. Pacemaker mechanism of mammalian sinoatrial node cells. En: *Electrophysiology of Sinoatrial and Atrioventricular Nodes*. Mazgalev T, Dreifus L, Michelson E, Alan R. Liss Alan R Inc 1988:33-52.
- Isacoff EY, Jan YN, Jan LY. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker  $\text{K}^{+}$  channel. *Nature* 1991; **353**:86-90.
- Isenberg G, Klockner U. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflügers Arch* 1982; **395**:30-41.
- Islam MA. Pharmacological modulations of cardiac ultra-rapid and slowly activating delayed rectifier currents: potential antiarrhythmic approaches. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2010; **5**(1):33-46.
- Isom LL, Catterall WA.  $\text{Na}^{+}$  channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996; **383**:307-8.
- Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; **54**:204-216.
- Jalife J. Déjà vu in the theories of atrial fibrillation dynamics. *Cardiovasc Res* 2011; **89**(4):766-75.
- Jan LY, Barbel S, Timpe L, Laffer C, Salkoff L, O'Farrell P, Jan YN. Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the Shaker locus in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983; **48**:233-45.
- Jangsangthong W, Kuzmenkina E, Khan IF, Matthes J, Hullin R, Herzig S. Inactivation of L-type calcium channels is determined by the length

of the N terminus of mutant beta(1) subunits. *Pflugers Arch* 2010; **459**:399-411.

Jerng HH, Qian Y, Pfaffinger PJ. Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* 2004; **87**:2380-96.

Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology* 2005; **20**:408-416.

Ji S, John SA, Lu Y, Weiss JN. Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. A novel property conferred by Kir3.4 subunit. *J Biol Chem* 1998; **273**:1324-1328.

Jiang M, Cabo C, Yao J, Boyden PA, Tseng G. Delayed rectifier K<sup>+</sup> currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc Res* 2000; **48**:34-43.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002a; **417**:515-22.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002b; **417**:523-6.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 2003a; **423**:33-41.

Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 2003b; **423**:42-8.

Jiang M, Zhang M, Tang DG, Clemo HF, Liu J, Holwitt D, Kasirajan V, Pond AL, Wettwer E, Tseng GN. KCNE2 protein is expressed in ventricles of different species, and changes in its expression contribute to electrical remodeling in diseased hearts. *Circulation* 2004; **109**:1783-8.

Jones E, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA. Cardiac I<sub>Kr</sub> channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem* 2004; **279**:44690-44694.

Josephson IR, Sánchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 1984; **54**:157-162.

Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a metanitosulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ Res* 1993; **72**:75-83.

Kääb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998; **98**:1383-93.

Kalifa J, Jalife J, Zaitsev AV, Bagwe S, Warren M, Moreno J, Berenfeld O, Nattel S. Intra-atrial pressure increases rate and organization of waves emanating from the superior pulmonary veins during atrial fibrillation. *Circulation* 2003; **108**:668-671.

Kalifa J, Tanaka K, Zaitsev AV, Warren M, Vaidyanathan R, Auerbach D, Pandit S, Vikstrom KL, Ploutz-Snyder R, Talkachou A, Atienza F, Guiraudon G, Jalife J, Berenfeld O. Mechanisms of wave fractionation at boundaries of high-frequency excitation in the posterior left atrium of the isolated sheep heart during atrial fibrillation. *Circulation* 2006; **113**:626-633.

Kanagaratnam P, Cherian A, Stanbridge RD, Glenville B, Severs NJ, Peters NS. Relationship between connexins and atrial activation during human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; **15**: 206-216

Kang MG, Campbell KP. Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 2003; **278**:21315-8.

Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri A, Parker TG, Liu PP, Backx PH. Relationship between K<sup>+</sup> channel down-regulation and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 1999; **517**:229-245.

Kass RS, Sanguinetti MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 1984; **84**:705-26.

Kass RS, Moss AJ. Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Clin Invest* 2003; **112**:810-815.



- Kato T, Yamashita T, Sagara K, Iinuma H, Fu LT. Progressive nature of paroxysmal atrial fibrillation. Observations from a 14-year follow-up study. *Circ J* 2004; **68**:568-72.
- Katz B. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 1949; **2**:285-299.
- Kennedy ME, Nemec J, Clapham DE. Localization and interaction of epitope-tagged GIRK1 and CIR inward rectifier K<sup>+</sup> channel subunits. *Neuropharmacol* 1996; **35**:831-839
- Kenyon JL, Gibbons WR. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979; **73**:139-57.
- Kerfant BG, Zhao D, Lorenzen-Schmidt I, Wilson LS, Cai S, Chen SR, Maurice DH, Backx PH. PI3Kgamma is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circ Res*. 2007; **101**:400-408.
- Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 2006; **118**: 10-24
- Kim YH, Lim DS, Lee JH, Shim WJ, Ro YM, Park GH, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim MK. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med* 2003; **35**: 336-349
- Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 2004a; **41**:745-54.
- Kim LA, Furst J, Butler MH, Xu S, Grigorieff N, Goldstein SA. I<sub>to</sub> channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K<sup>+</sup> channel-interacting protein 2. *J Biol Chem* 2004b; **279**:5549-54.
- Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 2005; **97**: 629-636
- Kin Y, Misumi Y, Ikehara Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem* 2001; **129**:289-95.
- Kirchhof P, Auricchio A, Bax J, Crijns H, Camm J, Diener HC, Goette A, Hindricks G, Hohnloser S, Kappenberger L, Kuck KH, Lip GY, Olsson B, Meinertz T, Priori S, Ravens U, Steinbeck G, Svernhage E, Tijssen J, Vincent A, Breithardt G. Outcome parameters for trials in atrial fibrillation: executive summary. Recommendations from a consensus conference organized by the German Atrial Fibrillation Competence NETwork (AFNET) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Eur Heart J* 2007; **28**:2803-2817.
- Klöckner U, Mikala G, Schwartz A, Varadi G. Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem* 1996; **271**:22293-6.
- Kneller J, Sun H, Leblanc N, Nattel S. Remodeling of Ca<sup>2+</sup>-handling by atrial tachycardia: evidence for a role in loss of rateadaptation. *Cardiovasc Res* 2002; **54**: 416-426.
- Knobloch K, Brendel J, Peukert S, Rosenstein B, Busch AE, Wirth KJ. Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel I(Kur) channel blockers, S9947 and S20951, on left vs. right pig atrium in vivo in comparison with the I(Kr) blockers dofetilide, azimilide, d,l-sotalol and ibutilide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; **366**:482-7.
- Koch SE, Bodi I, Schwartz A, Varadi G. Architecture of Ca<sup>2+</sup> channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* 2000; **275**:34493-500.
- Kong W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF. Isolation and characterization of the human gene encoding I<sub>to</sub>: further diversity by alternative mRNA splicing. *Am J Physiol* 1998; **275**:H1963-H1970.
- Kostin S, Klein G, Szalay Z, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res* 2002; **54**: 361-379
- Kourliouros A, Savelieva I, Kiotsekoglou A, Jahangiri M, Camm J. Current concepts in the

pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2009; **157**(2):243-52.

Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 1998; **392**:945-8.

Krogh-Madsen T, Abbott GW, Christini DJ. Effects of Electrical and Structural Remodeling on Atrial Fibrillation Maintenance: A Simulation Study. *Plos Comput Biol* 2012; **8**(2): e1002390.

Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993a; **362**:127-33.

Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 1993b; **364**:802-6.

Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; **57**:509-26.

Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KCHIP2) gene leads to a complete loss of  $I_{to}$  and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001; **107**:801-813.

Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 2003; **300**:1922-6.

Kuo A, Domene C, Johnson LN, Doyle DA, Vénien-Bryan C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure* 2005; **13**:1463-72.

Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK

expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 1999; **84**:146-152.

Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res* 2000; **46**: 463-475

Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T. Short-term desensitization of muscarinic  $K^+$  channel current in isolated atrial myocytes and possible role of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 1987; **410**:227-233.

Kurata HT, Fedida D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; **92**:185-208.

Kurokawa J, Abriel H, Kass RS. Molecular basis of the delayed rectifier current  $I_{Ks}$  in heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:873-882.

Kuryshv YA, Gudz TI, Brown AM, Wible BA. KChAP as a chaperone for specific  $K^+$  channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **278**:C931-41.

Kwak YG, Hu N, Wei J, George AL Jr, Grobaski TD, Tamkun MM, Murray KT. Protein kinase A phosphorylation alters Kv $\beta$ 1.3 subunit-mediated inactivation of the Kv1.5 potassium channel. *J Biol Chem* 1999; **274**:13928-13932.

Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS, Tseng YZ, Lien WP, Huang SK. Changes in the mRNA levels of delayed rectifier potassium channels in human atrial fibrillation. *Cardiology* 1999; **92**(4):248-55.

Lazar S, Dixit S, Marchlinski FE, Callans DJ, Gerstenfeld EP. Presence of left-to-right atrial frequency gradient in paroxysmal but not persistent atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2004; **110**(20):3181-6

Lee KS, Marban E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 1985; **364**:395-411.

Lee KW, Everett TH, Rahmutula D, Guerra JM, Wilson E, Ding C, Olgin JE. Pirfenidone prevents the development of a vulnerable substrate for atrial

- fibrillation in a canine model of heart failure. *Circulation* 2006; **114**: 1703-1712
- Lee TE, Philipson LH, Nelson DJ. N-type inactivation in the mammalian Shaker K<sup>+</sup> channel Kv1.4. *J Membr Biol* 1996; **151**:225-35.
- Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KvLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 1997; **15**:181-185.
- Leistad E, Aksnes G, Verburg E, Christensen G. Atrial contractile dysfunction after short-term atrial fibrillation is reduced by verapamil but increased by BAY K8644. *Circulation* 1996; **93**: 1747-1754.
- Lendeckel U, Müller C, Röcken C, Laube B, Täger M, Huth C, Klein HU, Goette A. Expression of opioid receptor subtypes and their ligands in fibrillating human atria. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2005; **28** Suppl 1:S275-9.
- Leonoudakis D, Mailliard W, Wingerd K, Clegg D, Vandenberg C. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci* 2001; **114**:987-98.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J* 1996; **15**:1004-11.
- Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **279**:F793-801.
- Levy S, Maarek M, Coumel P, Guize L, Lekieffre J, Medvedowsky JL, Sebaoun A. Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France : the ALFA study. The College of French Cardiologists. *Circulation* 1999; **99**:3028-3035.
- Lezoualc'h F, Steplewski K, Sartiani L, Mugelli A, Fischmeister R, Bril A. Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor isoforms, calcium handling proteins and ion channels in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; **357**:218-24.
- Li D, Zhang L, Kneller J, Nattel S. Potential ionic mechanism for repolarization differences between canine right and left atrium. *Circ Res*. 2001; **88**(11):1168-75.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996a; **78**:689-696.
- Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996b; **78**:903-915.
- Li HL, Qu YJ, Lu YC, Bondarenko VE, Wang S, Skerrett IM, Morales MJ. DPP10 is an inactivation modulatory protein of Kv4.3 and Kv1.4. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; **291**:C966-76.
- Li GR, Dong MQ. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Adv Pharmacol* 2010; **59**:93-134.
- Liang L, Pan Q, Liu Y, Chen H, Li J, Brugada R, Brugada P, Hong K, Perez GJ, Zhao C, Qi J, Zhang Y, Peng L, Li L, Chen YH. High sensitivity of the sheep pulmonary vein antrum to acetylcholine stimulation. *J Appl Physiol* 2008; **105**: 293-298.
- Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature* 1991; **353**:752-6.
- Litovsky SH, Antzelevitch C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 1988; **62**:116-126
- Lip GY, Tse HF, Lane DA. Atrial fibrillation. *Lancet* 2012; **379**: 648-61.
- Liu GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Brüggemann A, Kummer W, Veh RW, Daut J, Preisig-Müller R. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K<sup>+</sup> channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 2001; **532**:115-26.
- Liu WJ, Wang HT, Chen WW, Deng JX, Jiang Y, Liu J. Co-expression of KCNE2 and KCHIP2c modulates the electrophysiological properties of Kv4.2 current in COS-7 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008; **29**:653-60.
- Liu Z, Du L, Li M. Update on the slow delayed rectifier potassium current I<sub>Ks</sub>: role in modulating

cardiac function. *Curr Med Chem* 2012; **19**:1405-20.

Logan WF, Rowlands DJ, Howitt G, Holmes AM. Left atrial activity following cardioversion. *Lancet* 1965; **2**: 471-473.

Logothetis DE, Jin T, Lupyan D, Rosenhouse-Dantsker A. Phosphoinositidemediated gating of inwardly rectifying K(+) channels. *Pflugers Arch* 2007; **455**:83-95.

Lomax AE, Kondo CS, Giles WR. Comparison of time- and voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; **285**(5):H1837-48.

London B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Robertson GA. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1997; **81**:870-8.

London B, Wang DW, Hill JA, Bennet PB. The transient outward current in mice lacking the potassium channel gene Kv1.4. *J Physiol* 1998; **509**:171-182.

Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 2005a; **309**:897-903.

Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 2005b; **309**:903-8.

Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994; **372**:366-9.

Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I<sub>K1</sub>. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:625-38.

Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP<sub>2</sub> interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002; **34**:933-944.

López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels* 1993; **1**:61-71.

Lubitz SA, Benjamin EJ, Ellinor PT. Atrial fibrillation in congestive heart failure. *Heart Fail Clin* 2010; **6**:187-200.

Lundby A, Olesen SP. KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **346**:958-967.

Lundby A, Ravn LS, Svendsen JH, Olesen SP, Schmitt N. KCNQ1 mutation Q147R is associated with atrial fibrillation and prolonged QT interval. *Heart Rhythm* 2007; **4**:1532-41.

Lundquist AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA, Drinkwater DC, Murray KT, George AL Jr. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I<sub>Ks</sub>. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **38**:277-287.

MacKinnon R, Yellen G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Science* 1990; **250**:276-279.

MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991; **350**:232-5.

MacKinnon R, Aldrich RW, Lee AW. Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1993; **262**:757-9.

McMurray J, Køber L, Robertson M, Dargie H, Colucci W, Lopez-Sendon J, Remme W, Sharpe DN, Ford I. Antiarrhythmic effect of carvedilol after acute myocardial infarction: results of the Carvedilol Post-Infarct Survival Control in Left Ventricular Dysfunction (CAPRICORN) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2005; **45**:525- 30.

Maffie J, Rudy B. Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K<sup>+</sup> currents in neurons. *J Physiol* 2008; **586**:5609-23.

Maisel WH. Autonomic modulation preceding the onset of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**:1269-1073.

- Maisel WH, Stevenson LW. Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology and rationale for therapy. *Am J Cardiol* 2003; **91**:2D-8D
- Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW. Coexpression of beta 1 with cardiac sodium channel alpha subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol Pharmacol* 1996; **49**:30-9.
- Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2000; **101**:194-199.
- Manning WJ, Silverman DI, Katz SE, Riley MF, Come PC, Doherty RM, Munson JT, Douglas PS. Impaired left atrial mechanical function after cardioversion: relation to the duration of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 1994; **23**:1535-1540.
- Manning WJ, Silverman DI, Katz SE, Riley MF, Doherty RM, Munson JT, Douglas PS. Temporal dependence of the return of atrial mechanical function on the mode of cardioversion of atrial fibrillation to sinus rhythm. *Am J Cardiol* 1995; **75**:624-626.
- Mansour M, Mandapati R, Berenfeld O, Chen J, Samie FH, Jalife J. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation*. 2001; **103**: 2631-2636.
- Mantegazza M, Yu FH, Catterall WA, Scheuer T. Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:15348-53.
- Mark MD, Herlitz S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* 2000; **267**:5830-6.
- Marshall DA, Levy AR, Vidaillet H, Fenwick E, Slee A, Blackhouse G, Greene HL, Wyse DG, Nichol G, O'Brien BJ; AFFIRM and CORE Investigators. Costeffectiveness of rhythm versus rate control in atrial fibrillation. *Ann Intern Med* 2004; **141**:653-61.
- Marshall GE, Russell JA, Tellez JO, Jhund PS, Currie S, Dempster J, Boyett MR, Kane KA, Rankin AC, Workman AJ. Remodelling of human atrial K<sup>+</sup> currents but not ion channel expression by chronic  $\beta$ -blockade. *Pflugers Arch*. 2012; **463**(4):537-48.
- Martens JR, Kwak YG, Tamkun MM. Modulation of Kv channel alpha/beta subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med* 1999; **9**:253-8.
- Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, and Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for  $\beta$  adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 2002; **295**:496-499.
- Mary-Rabine L, Albert A, Pham TD, Hordof A, Fenoglio JJ Jr, Malm JR, Rosen MR. The relationship of human atrial cellular electrophysiology to clinical function and ultrastructure. *Circ Res* 1983; **52**:188-199.
- Mathie A, Woollorton JRA, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmac* 1998; **30**:13-24.
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature* 1987; **325**:156-9.
- Matsuda T, Masumiya H, Tanaka N, Yamashita T, Tsuruzoe N, Tanaka Y, Tanaka H, Shigenoba K. Inhibition by a novel anti-arrhythmic agent, NIP-142, of cloned human cardiac K<sup>+</sup> channel Kv1.5 current. *Life Sci* 2001; **68**:2017-24.
- Mauban JR, O'Donnell M, Warrier S, Manni S, Bond M. Akapscaffolding proteins and regulation of cardiac physiology. *Physiology (Bethesda)*. 2009; **24**:78-87.
- McCormack T, McCormack K, Nadal MS, Vieira E, Ozaita A, Rudy B. The effects of *Shaker*  $\beta$ -subunits on the human lymphocyte K<sup>+</sup> channel Kv1.3. *J Biol Chem* 1999; **274**:20123-20126.
- McCrossan ZA, Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004; **47**:787-821.
- McDonald TW, Yu Z, Ming Z, Palm E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SAN, Fishman GI. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I<sub>Kr</sub>. *Nature* 1997; **388**:289-292.

- McLerie M, Lopatin AN. Dominant-negative suppression of I(K1) in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *J Mol Cell Cardiol* 2003; **35**:367-78.
- Medi C, Sparks PB, Morton JB, Kistler PM, Halloran K, Rosso R, Vohra JK, Kumar S, Kalman JM. Pulmonary vein antral isolation for paroxysmal atrial fibrillation: results from long-term follow-up. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2011; **22**:137-41.
- Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest* 2005; **115**:2010-7
- Meszáros J, Ryder KO, Hart G. Transient outward current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Am J Physiol* 1996; **271**:H2360- H2368.
- Miake J, Marbán E, Nuss HB. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *J Clin Invest* 2003; **111**:1529-36.
- Michael G, Xiao L, Qi XY, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2009; **81**(3):491-9
- Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, Bauer JA. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **104**:174-180.
- Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Tang S, Schwartz A. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel pore. *FEBS Lett* 1993; **335**:265-9.
- Mikala G, Klöckner U, Varadi M, Eisfeld J, Schwartz A, Varadi G. cAMP-dependent phosphorylation sites and macroscopic activity of recombinant cardiac L-type calcium channels. *Mol Cell Biochem* 1998; **185**:95-109.
- Miller CL, Yan C. Targeting cyclic nucleotide phosphodiesterase in the heart: therapeutic implications. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010; **3**(5):507-515.
- Miller LK, Devi LA. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol Rev* 2011; **63**:461-70.
- Milstein ML, Musa H, Balbuena DP, Anumonwo JM, Auerbach DS, Furspan PB, Hou L, Hu B, Schumacher SM, Vaidyanathan R, Martens JR, Jalife J. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; **109**(31):E2134-43
- Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 1999; **9**:201-216.
- Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti M. A structural basis for drug induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**:12329-12333.
- Mitra R, Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**:5340-4.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the  $\text{K}^+$  selectivity filter. *Nature* 2001; **414**:37-42.
- Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing: structural, functional, and electrophysiological characteristics of new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1995; **91**: 1588-1595.
- Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna WP, Seward JB, Tsang TS. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation* 2006; **114**:119-125.
- Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1964; **67**:200-220.
- Molenaar P, Parsonage WA. Fundamental considerations of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in human heart failure. *Trends Pharmacol Sci*. 2005; **26**:368-374.
- Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD, Zaccolo M.

- Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res* 2004; **95**:67–75.
- Morales MJ, Castellino RC, Crews AL, Rasmusson RL, Strauss HC. A novel  $\beta$  subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel  $\alpha$  subunits. *J Biol Chem* 1995; **270**:6272–6277.
- Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'hahan N, Vivaudou M. The molecular basis of the specificity of action of  $K_{ATP}$  channel openers. *EMBO J* 2000; **19**:6644–6651.
- Mori Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 1996; **72**:83–109.
- Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The  $Na^+$  channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 2004; **123**:155–65.
- Mubagwa K, Flameng W, Carmeliet E. Resting and action potentials of nonischemic and chronically ischemic human ventricular muscle. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994; **5**:659–71.
- Müller-Ehmsen J, Näbauer M, Schwinger RH.  $Na^+$  channel modulating effect of the inotropic compound S(-)BDF 9196 in human myocardium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; **359**:60–4.
- Muñoz V, Grzeda KR, Desplantez T, Pandit SV, Mironov S, Taffet SM, Rohr S, Kléber AG, Jalife J. Adenoviral expression of  $I_{Ks}$  contributes to wavebreak and fibrillatory conduction in neonatal rat ventricular cardiomyocyte monolayers. *Circ Res* 2007; **101**:475–83.
- Murai T, Kakizuka A, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**:176–81.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993; **73**:386–94.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996; **93**:168–177.
- Näbauer M, Gerth A, Limbourg T, Schneider S, Oeff M, Kirchhof P, Goette A, Lewalter T, Ravens U, Meinertz T, Breithardt G, Steinbeck G. The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management. *Europace* 2009; **11**:423–434.
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type  $K^+$  channels. *Neuron* 2003; **37**:449–61.
- Nakahira K, Shi G, Rhodes KJ, Trimmer JS. Selective interaction of voltage-gated  $K^+$  channel beta-subunits with alpha-subunits. *J Biol Chem* 1996; **271**:7084–9.
- Nakamura TY, Coetzee WA, Vega-Saenz De Miera E, Artman M, Rudy B. Modulation of  $K_v4$  channels, key components of rat ventricular transient outward  $K^+$  current, by PKC. *Am J Physiol* 1997; **273**:H1775–86.
- Narayan SM, Krummen DE, Rappel WJ. Clinical mapping approach to diagnose electrical rotors and focal impulse sources for human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012; **5**:447–54.
- Nao T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, Inoue N, Matsumoto T, Yamada J, Shimizu A, Yoshiga Y, Yamagata T, Kobayashi S, Yano M, Hamano K, Matsuzaki M. Comparison of expression of connexin in right atrial myocardium in patients with chronic atrial fibrillation versus those in sinus rhythm. *Am J Cardiol* 2003; **91**: 678–683.
- Nasr IA, Bouzamondo A, Hulot JS, Dubourg O, Le Heuzey JY, Lechat P. Prevention of atrial fibrillation onset by beta-blocker treatment in heart failure: a meta-analysis. *Eur Heart J* 2007; **28**(4):457–62.

- Nattel S, Singh BN. Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am J Cardiol* 1999; **84**:11R-19R.
- Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers. A novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 1999; **9**:217-226.
- Nattel S, Li D, Yue L. Basic mechanisms of atrial fibrillation. Very new insights into very old ideas. *Annu Rev Physiol* 2000; **62**:51-77.
- Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002; **415**:219-226.
- Nattel S. Is atrial remodeling a viable target for prevention of atrial fibrillation recurrence? *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; **15**(8):885-6.
- Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 2007; **87**: 425-456.
- Nattel S, Frelin Y, Gaborit N, Louault C, Demolombe S. Ion-channel mRNA-expression profiling: Insights into cardiac remodeling and arrhythmic substrates. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:96-105.
- Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, Seipelt R, Schondube FA, Hasenfuss G, Maier LS. CaMKII-dependent diastolic SR Ca<sup>2+</sup> leak and elevated diastolic Ca<sup>2+</sup> levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 2010; **106**: 1134-1144.
- Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000; **525**:285-298.
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005; **85**:1205-53.
- Nernst W. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion. *Z Phys Chem* 1888; **2**:613-637.
- Nichols CG, Makhina EN, Pearson WL, Sha Q, Lopatin AN. Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ Res* 1996; **78**:1-7.
- Nygren A, Lomax AE, Giles WR. Optical mapping system for recording action potential durations in adult mouse left and right atrium. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2004; **5**:3576-7.
- Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985; **316**:443-6.
- Nishida M, MacKinnon R. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 2002; **111**:957-65.
- Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (*I<sub>to</sub>*) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:12-25.
- Noble D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol* 1984; **353**:1-50.
- Noda M, Suzuki H, Numa S, Stühmer W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett.* 1989; **259**:213-6.
- Núñez L, Vaquero M, Gómez R, Caballero R, Mateos-Cáceres P, Macaya C, Iriepa I, Gálvez E, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by S-nitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2006; **72**:80-9.
- O'Connell AD, Morton MJ, Hunter M. Two-pore domain K<sup>+</sup> channels-molecular sensors. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1566**:152-61.
- O'Hara T, Rudy Y. Quantitative Comparison of Cardiac Ventricular Myocyte Electrophysiology and Response to Drugs in Human and Non-Human Species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; **302**:H1023-H1030.
- O'Reilly JP, Wang SY, Kallen RG, Wang GK. Comparison of slow inactivation in human heart and rat skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel chimaeras. *J Physiol* 1999; **515**:61-73.
- Ogielska EM, Zagotta WN, Hoshi T, Heinemann SH, Haab J, Aldrich RW. Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K<sup>+</sup> channels. *Biophys J* 1995; **69**:2449-57.



- Ohno S, Zankov DP, Ding WG, Itoh H, Makiyama T, Doi T, Shizuta S, Hattori T, Miyamoto A, Naiki N, Hancox JC, Matsuura H, Horie M. KCNE5 (KCNE1L) Variants Are Novel Modulators of Brugada Syndrome and Idiopathic Ventricular Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011; **4**:352-61.
- Ohya S, Morohashi Y, Muraki K, Tomita T, Watanabe M, Iwatsubo T, Imaizumi Y. Molecular cloning and expression of the novel splice variants of K<sup>+</sup> channel-interacting protein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **282**:96-102.
- Savelieva I, Kakouros N, Kourliouros A, Camm AJ. Upstream therapies for management of atrial fibrillation: review of clinical evidence and implications for European Society of Cardiology guidelines. Part I: primary prevention. *Europace* 2011a; **13**(3):308-28.
- Savelieva I, Kakouros N, Kourliouros A, Camm AJ. Upstream therapies for management of atrial fibrillation: review of clinical evidence and implications for European Society of Cardiology guidelines. Part II: secondary prevention. *Europace* 2011b; **13**(5):610-25.
- Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet* 2006; **15**:2185-2191.
- Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 2007; **100**(3):309-27.
- Opolski G, Torbicki A, Kosior DA, Szulc M, Wozakowska-Kaplon B, Kolodziej P, Achremczyk P; Investigators of the Polish How to Treat Chronic Atrial Fibrillation Study. Rate control vs rhythm control in patients with nonvalvular persistent atrial fibrillation: the results of the Polish How to Treat Chronic Atrial Fibrillation (HOT CAFE) Study. *Chest* 2004; **126**:476-86.
- Oral H, Crawford T, Frederick M, Gadeela N, Wimmer A, Dey S, Sarrazin JF, Kuhne M, Chalfoun N, Wells D, Good E, Jongnarangsin K, Chugh A, Bogun F, Pelosi F Jr, Morady F. Inducibility of paroxysmal atrial fibrillation by isoproterenol and its relation to the mode of onset of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008; **19**:466-470.
- Ouadid H, Albat B, Nargeot J. Calcium currents in diseased human cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **25**:282-291.
- Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:851-872.
- Oxford GS, Yeh JZ. Interactions of monovalent cations with sodium channels in squid axon. I. Modification of physiological inactivation gating. *J Gen Physiol* 1985; **85**:583-602.
- Panyi G, Sheng Z, Deutsch C. C-type inactivation of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J* 1995; **69**:896-903.
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 1991; **349**:305-10.
- Patel AJ, Honoré E. Properties and modulation of mammalian 2P domain K<sup>+</sup> channels. *Trends Neurosci* 2001; **24**:339-46.
- Patel SP, Campbell DL, Strauss HC. Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol* 2002; **545**:5-11.
- Patel SP, Campbell DL. Transient outward potassium current,  $I_{to}$ , phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 2005; **569**:7-39.
- Patlak JB, Ortiz M. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J Gen Physiol* 1985; **86**:89-104.
- Patterson E, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R. Triggered firing in pulmonary veins initiated by *in vitro* autonomic nerve stimulation. *Heart Rhythm* 2005; **2**:624-631.
- Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005; **8**:279-87.

- Pelleg A, Belardinelli L. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 1993; **27**:54-61.
- Pelzmann B, Schaffer P, Mächler H, Rigler B, Koidl B. Adenosine inhibits the L-type calcium current in human atrial myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995; **351**:293-297.
- Pereon Y, Demolombe S, Baro I, Drouin E, Charpentier F, Escande D. Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am J Physiol* 2000; **278**:H1908-H1915.
- Pérez-García MT, López-López JR, González C. Kv $\beta$ 1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O<sub>2</sub> sensitivity to Kv4.2 but not to *Shaker* channels. *J Gen Physiol* 1999; **113**:897-907.
- Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003; **83**:117-61.
- Peterson BZ, Lee JS, Mulle JG, Wang Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys J* 2000; **78**:1906-20.
- Pioletti M, Findeisen F, Hura GL, Minor DL Jr. Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat Struct Mol Biol* 2006; **13**:987-95.
- Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I<sub>Kr</sub> channels. *J Biol Chem* 2000; **275**:5997-6006.
- Potreau D, Gómez JP, Fares N. Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res* 1995; **30**:440-448.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* 1994; **368**:67-70.
- Prystowsky EN, Camm J, Lip GY, Allessie M, Bergmann JF, Breithardt G, Brugada J, Crijns H, Ellinor PT, Mark D, Naccarelli G, Packer D, Tamargo J. The impact of new and emerging clinical data on treatment strategies for atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2010; **21**(8):946-58.
- Psaty BM, Manolio TA, Kuller LH, Kronmal RA, Cushman M, Fried LP, White R, Furberg CD, Rautaharju PM. Incidence of and risk factors for atrial fibrillation in older adults. *Circulation*. 1997; **96**:2455-61.
- Pu J, Wada T, Valdivia C, Chutkow WA, Burant CF, Makielski JC. Evidence of K<sub>ATP</sub> channels in native cardiac cells without SUR. *Biophys J* 2001; **80**:863-868.
- Pusch M. Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK. *Pflügers Arch* 1998; **437**:172-174.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, Ravens U, Wettwer E. Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative beta-subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J Physiol* 2005; **565**:751-6.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, Banse U, Jost N, Varró A, Tseng GN, Ravens U, Wettwer E. Functional modulation of the transient outward current I<sub>to</sub> by KCNE beta-subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res* 2006; **71**:695-703.
- Radicke S, Cotella D, Bortoluzzi A, Ravens U, Sblattero D, Wettwer E. DPP10 - A new putative regulatory  $\beta$  subunit of I<sub>to</sub> in failing and non-failing human heart. *Circulation* 2007; **116**:II.187.
- Radicke S, Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Ravens U, Wettwer E, Delpón E. Effects of MiRP1 and DPP6 beta-subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008; **154**:774-86.
- Raine AEG, Vaughan Williams EM. Adaptation to prolonged  $\beta$ -blockade of rabbit atrial, Purkinje, and ventricular potentials, and of papillary muscle contraction. Time-course of development of and recovery from adaptation. *Circ Res* 1981; **48**:804-812.
- Rajamani S, Anderson CL, Anson BD, January CT. Pharmacological rescue of human K<sup>+</sup> channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene

rescue without block. *Circulation* 2002; **105**:2830-2835.

Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. Crystal structure of the human beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 2011; **477**, 549-555.

Rasmusson RL, Morales MJ, Castellino RC, Zhang Y, Campbell DL, Strauss HC. C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K<sup>+</sup> channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 1995; **489**:709-21.

Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, Strauss HC. Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* 1998; **82**:739-50.

Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 2003; **58**:32-45.

Redpath CJ, Rankin AC, Kane KA, Workman AJ. Anti-adrenergic effects of endothelin on human atrial action potentials are potentially anti-arrhythmic. *J Mol Cell Cardiol* 2006; **40**:717-724.

Restier L, Cheng L, Sanguinetti MC. Mechanisms by which atrial fibrillation-associated mutations in the S1 domain of KCNQ1 slow deactivation of IKs channels. *J Physiol* 2008; **586**:4179-91.

Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O. Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* 1994; **369**:289-94.

Reuter H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 1973; **26**:1-43.

Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for screening and primary prevention. *Am J Cardiol*. 2003; **92**(4B):17K-22K.

Roberds SL, Knoth KM, Po S, Blair TA, Bennett PB, Hartshorne RP, Snyders DJ, Tamkun MM. Molecular biology of the voltage-gated potassium channels of the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1993; **4**:68-80

Roberts R. Genomics and cardiac arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**:9-21.

Roden MD, Yang T. Protecting the Heart Against Arrhythmias: Potassium Current Physiology and Repolarization Reserve. *Circulation*. 2005; **112**:1376-1378

Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel  $\beta$  subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001; **533**:119-125.

Rostock T, Steven D, Hoffmann B, Servatius H, Drewitz I, Sydow K, Müllerleile K, Ventura R, Wegscheider K, Meinertz T, Willems S. Chronic atrial fibrillation is a biatrial arrhythmia: data from catheter ablation of chronic atrial fibrillation aiming arrhythmia termination using a sequential ablation approach. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008; **1**(5):344-53

Roux B, MacKinnon R. The cavity and pore helices in the KcsA K<sup>+</sup> channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 1999; **285**:100-102.

Roy D, Talajic M, Nattel S, Wyse DG, Dorian P, Lee KL, Bourassa MG, Arnold JM, Buxton AE, Camm AJ, Connolly SJ, Dubuc M, Ducharme A, Guerra PG, Hohnloser SH, Lambert J, Le Heuzey JY, O'Hara G, Pedersen OD, Rouleau JL, Singh BN, Stevenson LW, Stevenson WG, Thibault B, Waldo AL; Atrial Fibrillation and Congestive Heart Failure Investigators. Rhythm control versus rate control for atrial fibrillation and heart failure. *N Engl J Med* 2008; **358**:2667-77.

Rücker-Martin C, Pecker F, Godreau D, Hatem SN. Dedifferentiation of atrial myocytes during atrial fibrillation: role of fibroblast proliferation in vitro. *Cardiovasc Res* 2002; **55**(1):38-52.

Rudy B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol* 1978; **283**:1-21.

Ruppersberg JP, Schröter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 1990; **345**:535-7.

Sakabe M, Fujiki A, Nishida K, Sugao M, Nagasawa H, Tsuneda T, Mizumaki K, Inoue H. Enalapril prevents perpetuation of atrial fibrillation by suppressing atrial fibrosis and overexpression of connexin43 in a canine model of atrial pacing-induced left ventricular dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; **43**: 851-859

Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K<sup>+</sup> channel in isolated pacemaker cells of mammalian heart. *Nature* 1983; **303**:250-253.

Salata JJ, Selnick HG, Lynch JJ. Pharmacological modulation of IKs: Potential for antiarrhythmic therapy. *Curr Med Chem* 2004; **11**:29-44

Sampson KJ, Terrenoire C, Cervantes DO, Kaba RA, Peters NS, Kass RS. Adrenergic regulation of a key cardiac potassium channel can contribute to atrial fibrillation: evidence from an IKs transgenic mouse. *J Physiol* 2008; **586**:627-637.

Samuel CS, Hewitson TD, Unemori EN, Tang ML. Drugs of the future: the hormone relaxin. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**:1539-1557

Sanders P, Berenfeld O, Hocini M, Jaïs P, Vaidyanathan R, Hsu LF, Garrigue S, Takahashi Y, Rotter M, Sacher F, Scavée C, Ploutz-Snyder R, Jalife J, Haïssaguerre M. Spectral analysis identifies sites of high-frequency activity maintaining atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2005; **112**:789-797.

Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990; **96**:195-215.

Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 1991; **260**:H393-H399.

Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK, Scott A, Siegl PK. Isoproterenol antagonizes prolongation of refractory period by the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. Mechanism of action. *Circ Res* 1991; **68**:77-84.

Sanguinetti M, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel. *Cell* 1995; **81**:299-307.

Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. Spectrum of HERG K<sup>+</sup> channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996a; **93**:2208-2212.

Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I<sub>Ks</sub> potassium channel. *Nature* 1996b; **384**:80-83.

Sanguinetti M, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006; **440**:463-469.

Sanguinetti MC. HERG1 channelopathies. *Pflugers Arch* 2010; **460**:265-76.

Sarmast F, Kolli A, Zaitsev A, Parisian K, Dhamoon AS, Guha PK, Warren M, Anumonwo JM, Taffet SM, Berenfeld O, Jalife J. Cholinergic atrial fibrillation: I(K,ACh) gradients determine unequal left/right atrial frequencies and rotor dynamics. *Cardiovasc Res* 2003; **59**:863-873.

Savelieva I, Kourliouros A, Camm J. Primary and secondary prevention of atrial fibrillation with statins and polyunsaturated fatty acids: review of evidence and clinical relevance. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2010; **381**:1-13.

Savelieva I, Kakouros N, Kourliouros A, Camm AJ. Upstream therapies for management of atrial fibrillation: review of clinical evidence and implications for European Society of Cardiology guidelines. Part I: primary prevention. *Europace* 2011a; **13**(3):308-28.

Savelieva I, Kakouros N, Kourliouros A, Camm AJ. Upstream therapies for management of atrial fibrillation: review of clinical evidence and implications for European Society of Cardiology guidelines. Part II: secondary prevention. *Europace* 2011b; **13**(5):610-25.

Schaffer P, Pelzmann B, Bernhart E, Lang P, Løkebø JE, Mächler H, Rigler B, Koidl B. Estimation of outward currents in isolated human

atrial myocytes using inactivation time course analysis. *Pflugers Arch* 1998; **436**:457–468.

Shcherbakova OG, Hurt CM, Xiang Y, Dell'Acqua ML, Zhang Q, Tsien RW, Kobilka BK. Organization of beta-adrenoceptor signaling compartments by sympathetic innervation of cardiac myocytes. *J Cell Biol*. 2007; **176**(4):521–533.

Scherf D. Premature beats and extra-systoles. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1958; **27**:489–492.

Schimpf R, Wolpert C, Gaita F, Giustetto C, Borggrefe M. Short QT syndrome. *Cardiovasc Res* 2005; **67**:357–366.

Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000; **19**:332–340.

Scholz EP, Welke F, Joss N, Seyler C, Zhang W, Scherer D, Völkers M, Bloehs R, Thomas D, Katus HA, Karle CA, Zitron E. Central role of PKC $\alpha$  in isoenzyme-selective regulation of cardiac transient outward current  $I_{to}$  and Kv4.3 channels. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **51**:722–9.

Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* 1992; **255**:1712–5.

Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999; **23**:20–1.

Schotten U, Ausma J, Stellbrink C, Sabatschus I, Vogel M, Frechen D, Schoendube F, Hanrath P, Allessie MA. Cellular mechanisms of depressed atrial contractility in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **103**: 691–698.

Schotten U, Greiser M, Benke D, Buerkel K, Ehrenteidt B, Stellbrink C, Vazquez Jimenez JF, Schoendube F, Hanrath P, Allessie M. Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res* 2002; **53**:192–201.

Schotten U, de Haan S, Neuberger HR, Eijssbouts S, Blaauw Y, Tieleman R, Allessie M. Loss of atrial contractility is primary cause of atrial dilatation during first days of atrial fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **287**:H2324–H2331.

Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev*. 2011; **91**(1):265–325.

Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002; **90**:939–50.

Schuhmann K, Voelker C, Höfer GF, Pflügelmeier H, Klugbauer N, Hofmann F, Romanin C, Groschner K. Essential role of the beta subunit in modulation of C-class L-type Ca<sup>2+</sup> channels by intracellular pH. *FEBS Lett* 1997; **408**:75–80.

Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H. KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 1997; **17**:267–268.

Schuster A, Lacinová L, Klugbauer N, Ito H, Birnbaumer L, Hofmann F. The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *EMBO J* 1996; **15**:2365–70.

Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000; **343**:262–7.

Sculptoreanu A, Rotman E, Takahashi M, Scheuer T, Catterall WA. Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel  $\alpha_1$  subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**:10135–9.

Seeböhm G. Kv7.1 in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009; **6**:1154–5.

Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; **81**:133–76.

- Serôdio P, Demiera EVS, Rudy B. Cloning of a novel component of A-type K<sup>+</sup> channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 1996; **75**:2174-2179.
- Shah SV, Gage BF. Cost-effectiveness of dabigatran for stroke prophylaxis in atrial fibrillation. *Circulation* 2011; **123**(22):2562-70.
- Shen MJ, Choi EK, Tan AY, Lin SF, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS. Neural mechanisms of atrial arrhythmias. *Nat Rev Cardiol* 2012; **9**:30-39.
- Shen NV, Pfaffinger PJ. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit proteins. *Neuron* 1995; **14**:625-33.
- Shen W, Kurachi Y. Mechanisms of adenosine mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995; **70**:274-291.
- Shibata EF, Drury T, Refsum H, Aldrete V, Giles W. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol* 1989; **257**:H1773-81.
- Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, Sweatt JD, Rhodes KJ, Trimmer JS. A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J Biol Chem* 2003; **278**:36445-54.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000; **52**:557-594.
- Siegelbaum SA, Tsien RW, Kass RS. Role of intracellular calcium in the transient outward current of calf Purkinje fibers. *Nature* 1977; **269**:611-613.
- Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994; **27**:1-40.
- Sih HJ, Zipes DP, Berbari EJ, Adams DE, Olgin JE. Differences in organization between acute and chronic atrial fibrillation in dogs. *J Am Coll Cardiol*. 2000; **36**: 924-931
- Simard C, Drolet B, Yang P, Kim RB, Roden DM. Polymorphism screening in the cardiac K<sup>+</sup> channel gene KCNA5. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **77**:138-144.
- Skanes AC, Mandapati R, Berenfeld O, Davidenko JM, Jalife J. Spatiotemporal periodicity during atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation*. 1998; **98**: 1236-1248.
- Skanes A. Vagally mediated stabilization: the latest spin on rotors in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009; **6**:1473-1474.
- Skasa M, Jungling E, Picht E, Schondube F, Luckhoff A. L-type calcium currents in atrial myocytes from patients with persistent and non-persistent atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2001; **96**:151-159.
- Slawsky MT, Castle NA. K<sup>+</sup> channel blocking actions of flecainide compared with those of propafenone and quinidine in adult rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **269**:66-74.
- Sleator W Jr. De Gubareff T. Transmembrane action potentials and contractions of human atrial muscle. *Am J Physiol* 1964; **206**:1000-1014.
- Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996; **379**:833-836.
- Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart: Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993; **101**:513-543.
- Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:377-90.
- Soh H, Goldstein SA. I SA channel complexes include four subunits each of DPP6 and Kv4.2. *J Biol Chem* 2008; **283**:15072-7.
- Sokolova O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure* 2001; **9**:215-20.
- Soto D, De Arcangelis V, Zhang J, Xiang Y. Dynamic protein kinase a activities induced by beta-adrenoceptors dictate signaling propagation for

substrate phosphorylation and myocyte contraction. *Circ Res*. 2009; **104**:770–779.

Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti M. Class III anti-arrhythmic drugs blocks HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanosulfonanilides. *Circ Res* 1996a; **78**:499-503.

Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the I<sub>Kr</sub> channel. *J Gen Physiol* 1996b; **107**:611-619.

Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; **102**:1178-85.

Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Cav1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004; **119**:19-31.

Stanfield PR, Nakajima S, Nakajima Y. Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K<sup>+</sup> channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002; **145**:47-179.

Stengl M, Volders PG, Thomsen MB, Spätjens RL, Sipido KR, Vos MA. Accumulation of slowly activating delayed rectifier potassium current (IKs) in canine ventricular myocytes. *J Physiol* 2003; **51**:777-786.

Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. A population-based study of the longterm risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/ Paisley study. *Am J Med* 2002; **113**:359-364.

Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989; **339**:597-603.

Summers RJ, McMartin LR. Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem*. 1993; **60**(1):10-23.

Sun H, Chartier D, Leblanc N, Nattel S. Intracellular calcium changes and tachycardia induced contractile dysfunction in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2001; **49**: 751-761.

Sun Y, Quan XQ, Fromme S, Cox RH, Zhang P, Zhang L, Guo D, Guo J, Patel C, Kowey PR, Yan GX. A novel mutation in the KCNH2 gene associated with short QT syndrome. *J Mol Cell Cardiol*. 2011; **50**:433-41

Swartz MF, Fink GW, Lutz CJ, Taffet SM, Berenfeld O, Vikstrom KL, Kasprovicz K, Bhatta L, Puskas F, Kalifa J, Jalife J. Left vs. right atrial difference in dominant frequency, K(+) channel transcripts, and fibrosis in patients developing atrial fibrillation after cardiac surgery. *Heart Rhythm* 2009; **6**: 1415-1422.

Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988; **242**:1042-5.

Tamargo J. Drug-induced torsade de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn J Pharmacol* 2000; **83**:1-19.

Tamargo J, Caballero R, Delpón E. Pharmacological approaches in the treatment of atrial fibrillation. *Curr Med Chem* 2004a; **11**:13-28.

Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004b; **62**:9-33.

Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Delpón E. I<sub>Kur</sub>/Kv1.5 channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; **18**:399-416.

Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balser JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001; **409**:1043-7.

Tao X, Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 2009; **326**:1668-74.

Terlau H, Heinemann SH, Stühmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 1991; **293**:93-6.

- Terrenoire C, Clancy CE, Cormier JW, Sampson KJ, Kass RS. Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circ Res* 2005; **96**:e25-34.
- Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M, Mercadier JJ, Hatem SN. Regulation of the transient outward  $K^+$  current by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circ Res* 1999; **85**:810-9.
- Thiedemann KU, Ferrans VJ. Left atrial ultrastructure in mitral valvular disease. *Am J Pathol* 1977; **89**:575-604.
- Thijssen VL, Ausma J, Borgers M. Structural remodelling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. *Cardiovasc Res*. 2001; **52**(1):14-24.
- Thrall G, Lane D, Carroll D, Lip GY. Quality of life in patients with atrial fibrillation: a systematic review. *Am J Med* 2006; **119**:448 e1-e19.
- Tian D, Frishman WH. Vernakalant: a new drug to treat patients with acute onset atrial fibrillation. *Cardiol Rev* 2011; **19**:41-4.
- Timpe LC, Fantl WJ. Modulation of a voltage-activated potassium channel by peptide growth factor receptors. *J Neurosci* 1994; **14**:1195-201.
- Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem* 1989; **264**:17907-12.
- Tomaselli GF, Marbán E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:270-283.
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. How far will you go to sense voltage? *Neuron* 2005; **48**:719-25.
- Tomita T, Takei M, Saikawa Y, Hanaoka T, Uchikawa S, Tsutsui H, Aruga M, Miyashita T, Yazaki Y, Imamura H, Kinoshita O, Owa M, Kubo K. Role of autonomic tone in the initiation and termination of paroxysmal atrial fibrillation in patients without structural heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; **14**(6):559-64.
- Trautwein W, Kassambara DG, Nelson RM, Hecht HH. Electrophysiological study of human heart muscle. *Circ Res*. 1962; **10**:306-12.
- Trautwein W, Uchizono K. Electron microscopic and electrophysiologic study of the pacemaker in the sinoatrial node of the rabbit heart. *Zellforsch Mikrosk Anat* 1963; **61**:96-109.
- Tripodskiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2009; **54**:1747-1762.
- Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC. Structural determinants and biophysical properties of HERG and KCNQ1 channel gating. *J Mol Cell Cardiol* 2003; **35**:27-35.
- Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, Hwang JJ, Kuo KT, Wu CK, Yu CC, Wang YC, Lai LP, Lin JL. Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2010; **55**:758-70.
- Tseng GN.  $I_{Kr}$ : The hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:835-849.
- Tseng-Crank JC, Tseng GN, Schwartz A, Tanouye MA. Molecular cloning and functional expression of a potassium channel cDNA isolated from a rat cardiac library. *FEBS Lett* 1990; **268**:63-8.
- Tucker SJ, Pessia M, Adelman JP. Muscarine-gated  $K^+$  channel: Subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am J Physiol* 1996; **271**:H379-H385.
- Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv $\beta$ 2.1 subunits. *J Biol Chem* 1996; **271**:2406-2412.
- Ulbricht W. Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* 2005; **85**:1271-301.
- Unsold B, Kerst G, Brouzos H, Hubner M, Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Bleich M. KCNE1 reverses the response of the human  $K^+$  channel KCNQ1 to cytosolic pH changes and alters



its pharmacology and sensitivity to temperature. *Pflügers Arch* 2000; **441**:368-378.

Valenzuela C, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J* 1995; **69**:418-27.

Van der Velden HM, van Kempen MJ, Wijffels MC, van Zijverden M, Groenewegen WA, Allesie MA, Jongsma HJ. Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998; **9**: 596-607

Van der Velden HMW, van der Zee L, Wijffels M, van Leuven C, Dorland R, Vos MA, Jongsma HJ, Allesie M. Atrial fibrillation in the goat induces changes in monophasic action potential and mRNA expression of ion channels involved in repolarization. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000; **11**:1262-1269.

Van Gelder IC, Hagens VE, Bosker HA, Kingma JH, Kamp O, Kingma T, Said SA, Darmanata JI, Timmermans AJ, Tijssen JG, Crijns HJ; Rate Control versus Electrical Cardioversion for Persistent Atrial Fibrillation Study Group. A comparison of rate control and rhythm control in patients with recurrent persistent atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2002; **347**:1834-40.

Van Veldhuisen DJ, Aass H, El Allaf D, Dunselman PH, Gullestad L, Halinen M, Kjekshus J, Ohlsson L, Wedel H, Wikstrand J; MERIT-HF Study Group. Presence and development of atrial fibrillation in chronic heart failure. Experiences from the MERIT-HF Study. *Eur J Heart Fail* 2006; **8**:539-46.

Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997; **80**(6):772-81.

Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca<sub>2</sub>p currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999; **85**:428-436.

Van Wagoner DR, Nerbonne JM. Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2000; **32**(6):1101-17.

Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**:2560-4.

Veldkamp MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde AA, Balser JR. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na<sup>+</sup> channel. *Circ Res* 2000; **86**:E91-7.

Venetucci LA, Trafford AW, Díaz ME, O'Neill SC, Eisner DA. Reducing ryanodine receptor open probability as a means to abolish spontaneous Ca<sup>2+</sup> release and increase Ca<sup>2+</sup> transient amplitude in adult ventricular myocytes. *Circ Res* 2006; **98**(10):1299-305

Verheule S, Sato T, Everett T, Engle SK, Otten D, Rubart-Von Der Lohe M, Nakajima HO, Nakajima H, Field LJ, Olgin JE. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* 2004; **94**: 1458-1465

Vilin YY, Makita N, George AL Jr, Ruben PC. Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels. *Biophys J* 1999; **77**:1384-93.

Virag L, Iost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szecsi J, Bogats G, Szenohradszky P, Varro A, Papp JG. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001; **49**:790-797.

Voigt N, Trausch A, Knaut M, Matschke K, Varró A, Van Wagoner DR, Nattel S, Ravens U, Dobrev D. Left-to-right atrial inward rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010; **3**:472-80.

Volders PG, Stengl M, van Opstal JM, Gerlach U, Späthjens RL, Beekman JD, Sipido KR, Vos MA. Probing the contribution of IKs to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation. *Circulation* 2003; **107**:2753-2760.

Wada K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ, Shimasaki S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**:197-201.

- Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2011; **121**(8):2955-68.
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup> channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 1998; **19**:366-70.
- Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz*. 2002; **27**(7):683-690.
- Walsh KB, Kass RS. Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science* 1988; **242**:67-69.
- Walton M, Fozzard HA. The relation of  $V_{max}$  to  $I_{Na}$ ,  $G_{Na}$ , and  $h$  infinity in a model of the cardiac Purkinje fiber. *Biophys J* 1979; **25**:407-420.
- Wang C, Zhang YJ, Wang YL, Xu YF, Liu S, Chen ZY, Liu LL. Effect of dipfluzine on delayed afterdepolarizations and triggered activity induced by isoprenaline in human atrial fibers. *Acta Pharmaceutica Sinica* 2006; **41**:184-187.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993; **73**:1061-1076.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994; **28**:1540-1546.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995a; **80**:805-11.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995b; **272**:184-96.
- Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kvβ1 subunits. *J Biol Chem* 1996; **271**:28311-7.
- Wang HS, Brown BS, McKinnon D, Cohen IS. Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and  $I_{Ks}$  channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol* 2000a; **57**:1218-1223.
- Wang J, Myers CD, Robertson GA. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol* 2000b; **115**:749-758.
- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J. Structural basis for modulation of Kv4 K<sup>+</sup> channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 2007; **10**:32-9.
- Wann LS, Curtis AB, January CT, Ellenbogen KA, Lowe JE, Estes NA 3rd, Page RL, Ezekowitz MD, Slotwimer DJ, Jackman WM, Stevenson WG, Tracy CM; 2006 WRITING COMMITTEE MEMBERS, Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Le Heuzey JY, Crijns HJ, Lowe JE, Curtis AB, Olsson SB, Ellenbogen KA, Prystowsky EN, Halperin JL, Tamargo JL, Kay GN, Wann LS; ACCF/AHA TASK FORCE MEMBERS, Jacobs AK, Anderson JL, Albert N, Hochman JS, Buller CE, Kushner FG, Creager MA, Ohman EM, Ettinger SM, Stevenson WG, Guyton RA, Tarkington LG, Halperin JL, Yancy CW. 2011 ACCF/AHA/HRS focused update on the management of patients with atrial fibrillation (Updating the 2006 Guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2011; **123**(1):104-23.
- Weerapura M, Nattel S, Chartier D, Caballero R, Hebert TE. A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol* 2002; **540**:15-27.
- Wei J, Wang DW, Alings M, Fish F, Wathen M, Roden DM, George AL Jr. Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Circulation* 1999; **99**:3165-71.
- Weidmann S. The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 1955; **127**:213-224.

- Weitl N, Seifert R. Distinct interactions of human beta1- and beta2-adrenoceptors with isoproterenol, epinephrine, norepinephrine, and dopamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; **327**(3):760-769.
- Wettwer E, Amos G, Gath J, Zerkowski HR, Reidemeister JG, Ravens U. Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1993; **27**:1662-1669.
- Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994; **75**:473-482.
- Wettwer E, Hála O, Christ T, Heubach JF, Dobrev D, Knaut M, Varró A, Ravens U. Role of  $I_{Kur}$  in controlling action potential shape and contractility in the human atrium: influence of chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2004; **110**:2299-306.
- Wetzel U, Boldt A, Lauschke J, Weigl J, Schirdewahn P, Dorszewski A, Doll N, Hindricks G, Dhein S, Kottkamp H. Expression of connexins 40 and 43 in human left atrium in atrial fibrillation of different aetiologies 2005; *Heart* **91**: 166–170.
- Wible BA, Yang Q, Kuryshv YA, Accili EA, Brown AM. Cloning and expression of a novel  $K^+$  channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 1998; **273**:11745-51.
- Wible BA, Wang L, Kuryshv YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased  $K^+$  efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3 $\beta$  in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002; **277**:17852-62.
- Wickenden AD, Jegla TJ, Kaprielian R, Backx PH. Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward  $K^+$  current in rat ventricle. *Am J Physiol* 1999; **276**:H1599-H1607.
- Wickman K, Nemec J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 1998; **20**:103-114
- Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995; **92**:1954-1968
- Wilde AA, Brugada R. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res* 2011; **108**:884-97
- Wilhelm M, Kirste W, Kuly S, Amann K, Neuhuber W, Weyand M, Daniel WG, Garlichs C. Atrial distribution of connexin 40 and 43 in patients with intermittent, persistent, postoperative atrial fibrillation. *Heart Lung Circ* 2006; **15**: 30–37
- Williams CP, Hu N, Shen W, Mashburn AB, Murray KT. Modulation of the human Kv1.5 channel by protein kinase C activation: role of the Kv $\beta$ 1.2 subunit. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **302**:545-50.
- Willoughby D, Wong W, Schaack J, Scott JD, Cooper DM. An anchored PKA and PDE4 complex regulates subplasmalemmal cAMP dynamics. *EMBO J*. 2006; **25**(10):2051-2061.
- Winfrey AT. Stably rotating patterns of reaction and diffusion. En: *Theoretical Chemistry* Eyring H, Hendenon D (Eds.) (New York: Academic) 1978; **4**:1-51.
- Winterberg H. Studien über herzflimmern. I. Über die wirkung des N. Bagus und accelerans auf das Flimmern des Herzens. *Pflügers Arch Physiol* 1907; **117**:223-256.
- Wissmann R, Baukrowitz T, Kalbacher H, Kalbitzer HR, Ruppersberg JP, Pongs O, Antz C, Fakler B. NMR structure and functional characteristics of the hydrophilic N terminus of the potassium channel beta-subunit Kvbeta1.1. *J Biol Chem* 1999; **274**:35521-5.
- Wolf PA, Benjamin EJ, Belanger AJ, Kannel WB, Levy D, D'Agostino RB. Secular trends in the prevalence of atrial fibrillation: The Framingham Study. *Am Heart J* 1996; **131**:790-795.
- Workman AJ. Cardiac adrenergic control and atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; **381**:235-239.
- Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. Cellular bases for human atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2008; **5**(6 Suppl):S1-6.
- Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2001; **52**: 226-235.
- Workman AJ, Kane KA, Russell JA, Norrie J, Rankin AC. Chronic beta-adrenoceptor blockade

and human atrial cell electrophysiology: evidence of pharmacological remodelling. *Cardiovasc Res* 2003; **58**:518–525.

Wyse DG, Waldo AL, DiMarco JP, Domanski MJ, Rosenberg Y, Schron EB, Kellen JC, Greene HL, Mickel MC, Dalquist JE, Corley SD; Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) Investigators. A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2002; **347**:1825–33.

Wyse DG. Rate control vs rhythm control strategies in atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis* 2005; **48**:125–38.

Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **332**(4):1012–9.

Xiang Y. Compartmentalization of  $\beta$ -Adrenergic Signals in Cardiomyocytes. *Circ Res* 2011; **109**:231–244.

Xiang Y, Kobilka BK. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science*. 2003; **300**:1530 – 1532.

Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, Han Q. Subtype-specific  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;**27**:330 –337.

Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol* 2008; **586**:1833–1848.

Xu J, Yu W, Jan YN, Jan LY, Li M. Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the  $\alpha$ -subunits. *J Biol Chem* 1995; **270**:24761–8.

Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1999; **113**:661–78.

Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev* 1998; **50**:723–60.

Yamazaki M, Vaquero LM, Hou L, Campbell K, Zlochiver S, Klos M, Mironov S, Berenfeld O, Honjo H, Kodama I, Jalife J, Kalifa J. Mechanisms of stretch-induced atrial fibrillation in the presence and the absence of adrenergic stimulation: interplay between rotors and focal discharges. *Heart Rhythm* 2009; **6**:1009–1017.

Yang NB, Horn R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channel. *Neuron* 1995; **15**:213–218.

Yang T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1995; **77**:1246–1253.

Yang N, George AL Jr, Horn R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 1996; **16**:113–22.

Yang EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K. Kv $\beta$  subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J Biol Chem* 2001; **276**:4839–44.

Yang D, Song LS, Zhu WZ, Chakir K, Wang W, Wu C, Wang Y, Xiao RP, Chen SR, Cheng H. Calmodulin regulation of excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circ Res* 2003; **92**:659–67.

Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004; **75**:899–905.

Yeh YH, Qi X, Shiroshta-Takeshita A, Liu J, Maguy A, Chartier D, Hebert T, Wang Z, Nattel S. Atrial tachycardia induces remodelling of muscarinic receptors and their coupled potassium currents in canine left atrial and pulmonary vein cardiomyocytes. *Br J Pharmacol*. 2007; **152**:1021–32.

Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify

- the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 1991; **251**:939-42.
- Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002; **419**:35-42.
- Yeola SW, Rich TC, Uebele VN, Tamkun MM, Snyders DJ. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* 1996; **78**:1105-14.
- Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998; **274**:C25-37.
- Yool AJ, Schwarz TL. Alteration of ionic selectivity of a K<sup>+</sup> channel by mutation of the H5 region. *Nature* 1991; **349**:700-4.
- Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 2003; **4**(3):207.
- Yuan W, Ginsburg KS, Bers DM. Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol* 1996; **493**:733-46.
- Zaccolo M, Pozzan T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*. 2002; **295**(5560):1711-1715.
- Zaccolo M, Movsesian MA. cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res* 2007; **100**(11):1569-78.
- Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 1990; **250**:568-71.
- Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K<sup>+</sup> current ( $I_{K1}$ ) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 2001; **533**:697-710.
- Zhang H, Kharche S, Holden AV, Hancox JC. Repolarisation and vulnerability to re-entry in the human heart with short QT syndrome arising from KCNQ1 mutation—a simulation study. *Prog Biophys Mol Biol* 2008; **96**:112-31.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 1994; **372**:97-100.
- Zhang M, Jiang M, Tseng GN. MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as  $\beta$  subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 2001; **88**:1012-1019.
- Zhang Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K<sup>+</sup> channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem* 2003; **278**:10417-10426.
- Zhang DF, Liang B, Lin J, Liu B, Zhou QS, Yang YQ. KCNE3 R53H substitution in familial atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl)* 2005; **118**:1735-8.
- Zhou Z, Gong Q, Epstein ML, January CT. HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* 1998; **273**:21061-21066.
- Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 2001; **411**:657-61.
- Zhou Y, MacKinnon R. The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* 2003; **333**:965-975.
- Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol* 2004; **561**:735-748.
- Zimmer T, Surber R. SCN5A channelopathies: an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2008; **98**:120-36.
- Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 1999; **399** (6732):159-62.